

Mihovil Horvat

**Terapijsko praćenje olanzapina:
Validacija metode i klinička primjena**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za farmakologiju i u Laboratoriju za multidisciplinarnu primjenu kromatografije na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mile Lovrić i izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

Zahvaljujem se mentorima, prof.dr.sc. Lidiji Bach-Rojecky i doc.dr.sc. Mili Lovrić što su me prihvatili kao diplomanda i što su mi omogućili da napravim ovaj rad pod njihovim mentorstvom i stručnim angažmanom. Posebno se zahvaljujem Predragu Donatu-Švaljeku što mi je iscrpno pomagao u izradi eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada i Luciji Franin na stalnoj podršci.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Farmakologija olanzapina	1
1.1.1. Farmakodinamički profil.....	1
1.1.2. Indikacije	2
1.1.3. Načini primjene i doziranje	2
1.1.4. Farmakokinetika.....	3
1.1.5. Nuspojave i post-injekcijski sindrom.....	4
1.2. Terapijsko praćenje koncentracije lijeka u neuropsihofarmakologiji	6
1.2.1. Načela terapijskog praćenja koncentracije lijeka	8
1.2.2. Terapijski referentni raspon	9
1.2.3. Praktični aspekti	10
1.2.4. Primjena i indikacije za praćenje koncentracije lijeka u krvi.....	11
1.3. Primjena kromatografske metode u terapijskom praćenju koncentracije lijeka..	12
1.3.1. Temeljni principi kolonske kromatografije.....	13
1.3.2. Osnovni pojmovi i teorijska pozadina.....	14
1.3.3. Načini izvedbe kromatografske analize	15
1.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	16
1.4. Validacija bioanalitičke metode	18
1.4.1. Validacijski parametri	18
1.4.1.1. Selektivnost	18
1.4.1.2. Kalibracijski model i linearnost	19
1.4.1.3. Točnost	19
1.4.1.4. Preciznost	20
1.4.1.5. Analitička osjetljivost.....	20
1.4.1.6. Stabilnost.....	21
1.4.2. Procjena referentnih intervala	21
2. OBRAZLOŽENJE TEME	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Uzorci	23
3.1.2. Oprema	23
3.1.3. Kemikalije	24
3.1.4. Laboratorijski pribor	24
3.2. Metode.....	25
3.2.1. Postupanje s uzorcima bolesnika.....	25

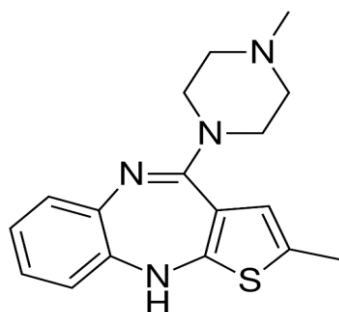
3.2.2. Ekstrakcija uzoraka	25
3.2.3. Kromatografski uvjeti	26
3.2.4. Priprema mobilne faze	26
3.2.5. Priprema kalibratora i izrada kalibracijske krivulje	27
3.2.6. Priprema uzoraka za unutarnju kontrolu kvalitete:	27
3.3. Ispitivanje validacijskih parametara	28
3.3.1. Selektivnost	28
3.3.2. Linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon.....	29
3.3.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije	30
3.3.4. Preciznost	30
3.3.5. Točnost	30
3.3.6. Referentni interval.....	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Selektivnost	32
4.2. Linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon.....	35
4.3. Osjetljivost metode.....	37
4.3.1 Granica detekcije (LOD)	37
4.3.2 Granica kvantifikacije (LOQ)	38
4.4. Preciznost	39
4.4.1. Ponovljivost (preciznost u seriji).....	39
4.4.2. Međupreciznost (preciznost iz dana u dan).....	41
4.5. Točnost	42
4.6. Referentni interval	46
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA	51
7. Sažetak/Summary	54
8. Prilozi	56
8.1. Popis kratica	56
Temeljna dokumentacijska kartica	

1. UVOD

1.1. Farmakologija olanzapina

Antipsihotici su lijekovi koji ublažuju psihotične simptome u različitim stanjima. Mogu poboljšati raspoloženje i ublažiti anksioznost i poremećaje spavanja. Primarna su terapija kod bipolarnog poremećaja, različitih vrsta psihoza, uključujući i shizofreniju. Iako nijedan bolesnik nije u potpunosti izliječen, antipsihotici su smanjili potrebu za dugotrajnom hospitalizacijom i omogućili normalno svakodnevno funkcioniranje bolesnika uz psihosocijalnu potporu. Danas se najviše koriste atipični antipsihotici, prvenstveno zbog svoje učinkovitosti i boljeg profila nuspojava u usporedbi s konvencionalnim antipsihoticima.

Atipični antipsihotici imaju kompleksnu farmakologiju, ali zajedničko im je da imaju veću sposobnost mijenjanja aktivnosti serotoninskih 5-HT_{2A} receptora, nego dopaminskih D₂ receptora. Iako svi antipsihotici blokiraju dopaminske D₂ receptore, stupanj te blokade i učinci na druge receptore značajno se razlikuju između lijekova (Meltzer, 2011). Jedan od takvih lijekova je i olanzapin koji se, zbog dobre podnošljivosti, danas često koristi za uklanjanje simptoma shizofrenije.



Olanzapin, sintetski derivat tienobenzodiazepina (Slika 1), psihotropni je agens koji pripada drugoj generaciji antipsihotičnih lijekova, tzv. atipičnim antipsihoticima (Eli Lilly and Company, 2004).

Slika 1. Kemijska struktura olanzapina: 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepin (preuzeto iz Eli Lilly and Company, 2004).

1.1.1. Farmakodinamički profil

Olanzapin ima relativno visok afinitet vezanja serotoninskih 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, histaminskih H₁ i muskarinskih M₁ receptora, dok slabijim afinitetom veže dopaminske D₂ i α_1 -adrenergičke receptore. Zabilježeno je i manje značajno vezanje olanzapina za dopaminske D₁, D₃, D₄; muskarinske M₂, M₃, M₄, M₅; β -adrenergičke receptore i benzodiazepinsko vezno mjesto na GABA_A receptoru (Eli Lilly and Company, 2004). Vezanje velikog broja receptora

diktira farmakodinamički profil olanzapina. Zbog niskog omjera afiniteta vezanja dopaminskih D₂ i serotoninskih 5-HT_{2A} receptora (D₂/5-HT_{2A} omjer) olanzapin ima visoku kliničku potentnost i vrlo nisku ekstrapiramidnu toksičnost. Kombinacija slabijeg stupnja blokade dopaminskih D₂ receptora uz kinetiku brze disocijacije liganda s receptora u mezolimbickom putu i antagonizma serotoninskih 5-HT_{2A} receptora u frontalnom korteksu odgovorna je za antipsihotično djelovanje olanzapina (Meltzer, 2011). Pretpostavlja se da blokada D₂ receptora ublažava pozitivne simptome (halucinacije, deluzije), a blokada 5HT_{2A} receptora negativne simptome (bezvoljnost, emocionalna ravnodušnost) shizofrenije (Eli Lilly and Company, 2004).

1.1.2. Indikacije

Shizofrenija i druge psihoze temeljna su indikacija za primjenu olanzapina. Također je moguća primjena kod bolesnika s bipolarnim afektivnim poremećajem, psihotičnom depresijom, shizoafektivnim poremećajem, a potvrđena je i djelotvornost monoterapije olanzapinom u akutnoj fazi (do 4 tjedna) manije (Meltzer, 2011). Olanzapin se može koristiti i kao pomoćna terapija za kontrolu ponašanja i simptoma u demencijama (Green, 2008). Kao i drugi atipični antipsihotici, olanzapin se uobičajeno prepisuje u terapiji održavanja. Iako je kod rezistentne shizofrenije najučinkovitiji klopazin, neke kliničke studije sugeriraju da visoke doze olanzapina (30-45 mg/dan) mogu također biti djelotvorne ako se primjenjuju tijekom 6 mjeseci (Meltzer, 2011). Dobra učinkovitost i profil nuspojava upućuju na mogućnost primjene olanzapina kao prvu liniju liječenja psihotičnih poremećaja. Uz to, olanzapin može biti dobra zamjena za konvencionalne antipsihotike u liječenju rezistentnih simptoma (Green, 2008).

1.1.3. Načini primjene i doziranje

Olanzapin se može davati u podijeljenim dnevnim dozama peroralno, titrirajući do djelotvornih doza. Minimalna djelotvorna terapijska doza je 5 mg, a uobičajen raspon dnevnih doza je 10-30 mg. Niže doze treba iskušati tijekom barem nekoliko tjedana. Jednokratno dnevno doziranje, obično uvečer, prikladno je za mnoge bolesnike tijekom kronične terapije održavanja, a pojednostavnjenje režima doziranja rezultira boljom suradljivošću bolesnika (Meltzer, 2011).

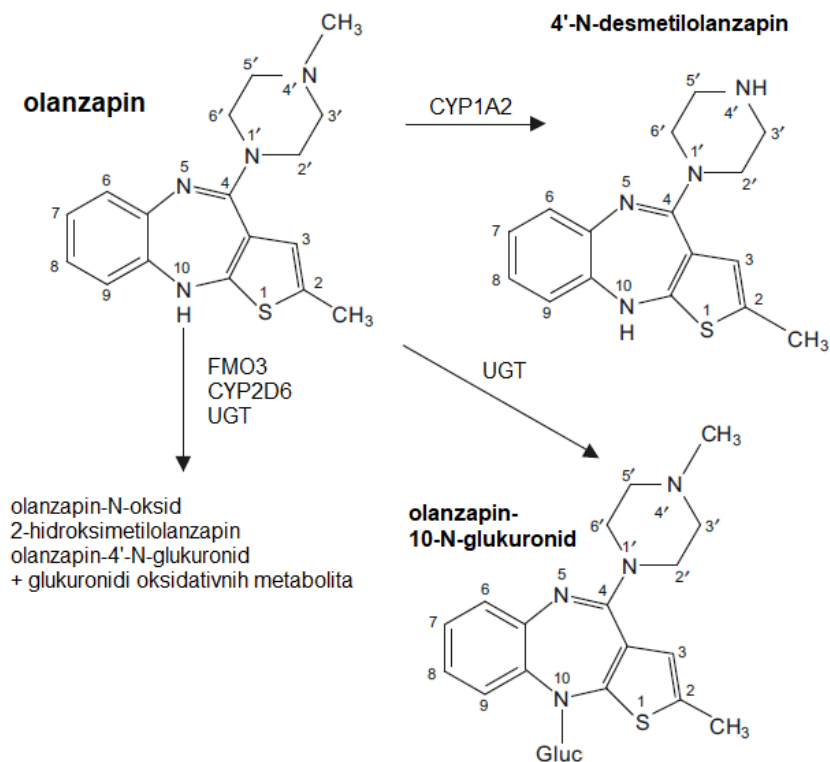
Osim peroralne primjene, olanzapin se često primjenjuje i parenteralno kako bi se brže postigle djelotvorne koncentracije lijeka u krvi. Dugodjelujuća injekcija (LAI, *engl.* long-acting injectable) olanzapina je depo formulacija koja se sastoji od vodene suspenzije slabo topljive

soli olanzapin-pamoata (monohidrat). Glavna karakteristika ove formulacije je veća topljivosti soli u krvi nego u mišićnom tkivu. Time je na mjestu uboda injekcije omogućeno polagano otapanje tijekom dužeg vremena, pri čemu disocirana aktivna komponenta lijeka, nakon što se apsorbira u krvotok, može odmah početi djelovati. Sistemske koncentracije olanzapina mjerljive su u roku od nekoliko minuta do sati, dok se vršne koncentracije obično postižu unutar prvog tjedna nakon injekcije, a zatim postupno opadaju tijekom sljedećih nekoliko tjedana te održavaju terapijske koncentracije olanzapina u sistemske cirkulaciji 2 do 4 tjedna (McDonnell i sur., 2010). Injekcije se primjenjuju u mišić stražnjice svaka 2 do 4 tjedna. Doze se kreću od 45 do 405 mg olanzapin-pamoata, a injekcije dane u intervalima od 2 tjedna ne bi smjele prijeći dozu od 300 mg. Takva formulacija olanzapina, osim što poboljšava adherenciju, vrlo je učinkovita u liječenju psihotičnih i stabilnih stanja shizofrenije (Detke i sur., 2010).

1.1.4. Farmakokinetika

Olanzapin se dobro apsorbira, a brzina i opseg apsorpcije nisu ovisni o hrani. Vršne koncentracije olanzapina postižu se otprilike 6 sati nakon oralne doze, dok depo intramuskularna formulacija olanzapina zbog brže apsorpcije postiže vršne koncentracije nakon 15 do 45 minuta. Bioraspoloživost (frakcija koja je apsorbirana) olanzapina iznosi 80 %. Intenzivno se izlučuje prvim prolaskom kroz jetru, pri čemu se približno 40 % doze metabolizira prije dolaska u sistemske cirkulaciju. Poluživot olanzapina prosječno iznosi 33 sata. Olanzapin se opsežno raspodjeljuje u svim dijelovima tijela (pogotovo u mozak) s volumenom raspodjele od približno 1000 L. Zbog svoje lipofilnosti, 93% olanzapina vezano je na proteine plazme, primarno na albumin i α_1 -kiseli glikoprotein. Kako bi se preveo u vodi topljive spojeve koji se lakše izlučuju, olanzapin podliježe reakcijama prve i druge faze metabolizma. Glavni metabolički putovi olanzapina su izravna glukuronidacija kojom nastaju 10-N-glukuronid i 4'-N-glukuronid olanzapina te oksidacija posredovana izoenzimom iz skupine citokrom P450 (CYP) 1A2 kojom nastaje 4'-N-desmetilolanzapin (Slika 2). Oksidacija posredovana s CYP2D6 predstavlja minorni metabolički put, dok je enzimski sustav flavin-monooksigenaze FMO3 odgovoran za N-oksidaciju olanzapina. Nakon višestrukog doziranja, glavni cirkulirajući metaboliti prisutni u trenutku ravnotežnog stanja su 10-N-glukuronid (44%) i 4'-N-desmetilolanzapin (31%) (Eli Lilly and Company, 2004.). Kod oba metabolita izostaje farmakološka aktivnost. (Callaghan i sur., 1999). Oko 57% doze izlučuje se urinom, a 30% doze fecesom. Značajne interakcije olanzapina s drugim lijekovima odnose se na metabolički put posredovan s CYP 1A2 enzimom. Induktori CYP1A2 poput karbamazepina i policikličkih

aromatskih ugljikovodika iz cigaretnog dima smanjuju plazmatske koncentracije olanzapina. S druge strane, fluvoksamin kao inhibitor CYP1A2 smanjuje klirens olanzapina, što znatno može doći do izražaja kad bolesnik uzima niže doze olanzapina (Eli Lilly and Company, 2004).



Slika 2. Metabolički putevi olanzapina (preuzeto iz Callaghan i sur., 1999).

Farmakokinetika olanzapina je linearna i proporcionalna dozi unutar kliničkog područja doziranja, što znači da udvostručenje dnevne doze rezultira udvostručenjem koncentracije olanzapina u krvi. Interindividualni čimbenici s najvećim utjecajem na farmakokinetiku olanzapina su dob, spol i status pušača (Callaghan i sur., 1999). Kumulativni učinak spola, dobi i statusa pušača može dovesti do značajnih farmakokinetičkih razlika u populaciji i tada može biti potrebna prilagodba doze kod određenih bolesnika (Eli Lilly and Company, 2004). Učinci pušenja bi se trebali uzeti u obzir ako osoba puši više od 10 cigareta dnevno, a prestanak teškog pušenja tijekom terapije olanzapinom ponekad može zahtijevati i smanjenje doze uz praćenje koncentracije lijeka u krvi (Hiemke i sur., 2018).

1.1.5. Nuspojave i post-injekcijski sindrom

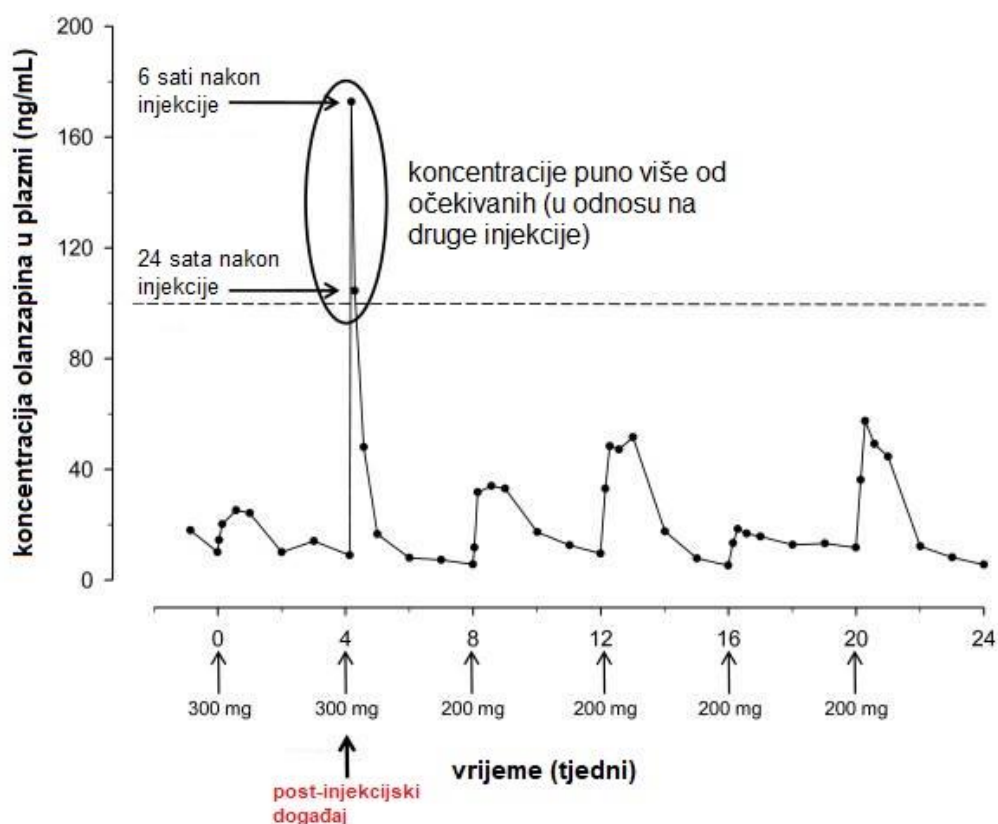
Profil nuspojava odlučujući je čimbenik primjene bilo kojeg antipsihotika (Green, 2008). Većina neželjenih učinaka javlja se zbog produljenog farmakološkog djelovanja lijeka.

Iako bolesnici dobro podnose olanzapin, zbog svoje neselektivnosti tj. djelovanja na brojne tipove i podtipove receptora uzrokuje nuspojave koje zahvaćaju različite organske sustave. Zbog blokade muskarinskih receptora autonomnog živčanog sustava može doći do antikolinergičnih nuspojava kao što su suha usta, teškoće pri mokrenju i opstipacija. Ortostatska hipotenzija i sedacija mogu biti posljedica blokade α_1 -adrenoreceptora. Toksična konfuzna stanja mogu se javiti zbog vrlo visokih doza olanzapina i izraženih antimuskarinskih učinaka. Svojstvo olanzapina da se brže otpušta s D_2 receptora u usporedbi s konvencionalnim antipsihoticima, smanjuje rizik od disfunkcije ekstrapiramidalnog sustava i tardivne diskinezije, kao i hiperprolaktinemije. Blokada histaminskih H_1 receptora uzrokuje somnolenciju/sedaciju i povećanje apetita, dok blokada $5-HT_{2C}$ receptora smanjenje osjećaja sitosti. Česta nuspojava olanzapina je porast težine do kojega vjerojatno dolazi zbog kombinirane blokade histaminskih i serotoninских receptora. Štetni učinci na metabolizam očituju se hiperglikemijom i hiperlipidemijom. Kod nekih bolesnika se razvija metabolički sindrom koji uključuje inzulinsku rezistenciju. Ovo su ujedno i najopasnije nuspojave olanzapina koje mogu završiti kardiovaskularnom bolešću ili komplikacijama kao što je dijabetička ketoacidoza (Meltzer, 2011).

Iako je sigurnosni profil intramuskularno primijenjenog olanzapina sličan profilu olanzapina za oralnu primjenu, zabilježeni su slučajevi u kojima se, nedugo nakon injekcije, javlja skup simptoma karakteriziranih delirijem i/ili prekomjernom sedacijom, tzv. post-injekcijski sindrom. Smatra se da je uzrok tome slučajni unos dijela doze tj. prebrzi ulazak veće količine olanzapina u krvotok umjesto u mišić zbog ozljede krvne žile prilikom ubrizgavanja lijeka. Simptomi su slični kao kod oralnog predoziranja olanzapinom. Delirij uključuje reverzibilni gubitak kognitivnih funkcija zbog čega je osoba dezorijentirana, smetena i ima poremećaj govora. Sedacija može biti različitog intenziteta od somnolencije do nesvjestice. Općenito, intenzitet simptoma ovisi o količini lijeka koji je slučajno unesen u sistemska cirkulaciju. Simptomi se u većini slučajeva javljaju unutar prvih sat vremena nakon injekcije. Bolesnici se uglavnom potpuno oporave unutar 3 dana od pojave sindroma, a terapija intramuskularnim olanzapinom nastavlja se istim ili nižim režimom. Budući da pravilna tehnika ubrizgavanja ne može u potpunosti isključiti ozljedu krvne žile tijekom postupka, potrebno je pratiti bolesnika nakon svake injekcije najmanje 3 sata (Detke i sur., 2010).

Koncentracije olanzapina povezane s post-injekcijskim sindromom nisu ovisne o ukupnoj primijenjenoj dozi, već o dijelu doze koji prerano ulazi u sistemska cirkulaciju.

(McDonnell i sur., 2010). Slučaj previsoke koncentracije olanzapina u krvi bolesnika s post-injekcijskim sindromom prikazan je na Slici 3.

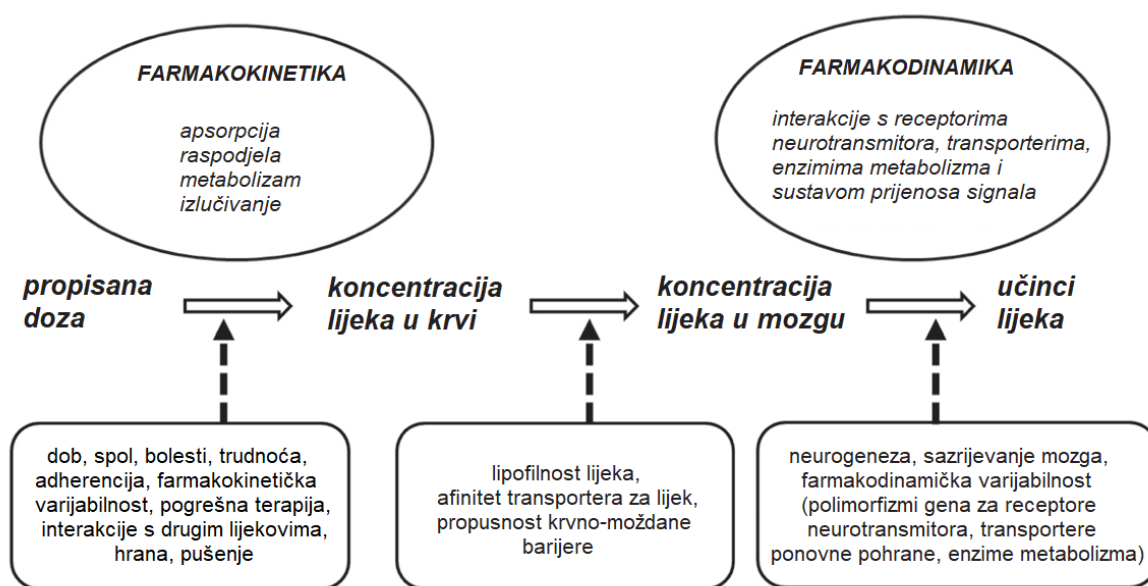


Slika 3. Koncentracije olanzapina u plazmi tijekom 6 primljenih injekcija kod bolesnika koji je doživio post-injekcijski sindrom nakon druge injekcije. 6 i 24 sata nakon druge injekcije izmjerene koncentracije su znatno više od očekivanih. Ipak, koncentracije se nakon 48 sati vraćaju unutar očekivanog terapijskog raspona. Maksimalne koncentracije olanzapina u post-injekcijskom sindromu su uglavnom veće od 100 ng/mL (preuzeto iz McDonnell i sur., 2010).

1.2. Terapijsko praćenje koncentracije lijeka u neuropsihofarmakologiji

Glavni preduvjet za praćenje lijeka u krvi je postojanje korelacije između terapijskog učinka i/ili nuspojava i nivoa lijeka u krvi. Općenito, određivanje koncentracije lijeka može biti korisno kada se očekuje promjena kinetike lijeka zbog različitih čimbenika ili stanja bolesnika ili kada se nuspojave javljaju već kod terapijskih koncentracija lijekova. Na temelju izmjerenih koncentracija mogu se utvrditi promjene u apsorpciji, volumenu raspodjele ili eliminaciji. Ti podaci mogu biti korisni za određivanje novog, boljeg režima doziranja (Plavšić i sur., 1992).

Mjerenje koncentracije lijeka u krvi radi individualizacije terapije zahtijeva poznavanje farmakokinetike lijeka na temelju koje se bira način uzorkovanja i izračunavanje optimalnog intervala doziranja. Manjak korelacije između doze i koncentracije lijeka u krvi može biti posljedica promjene normalne farmakokinetike tog lijeka u bilo kojoj fazi njegova puta kroz organizam (Slika 4). Mjerenje koncentracije lijeka u krvi u svrhu određivanja ispravne doze ima smisla za lijekove kod kojih je jasna korelacija između koncentracije u krvi i učinka (Plavšić i sur., 1992). Razine olanzapina u serumu dobro koreliraju s terapijskim učinkom, iako se početak antipsihotičnih učinaka može očekivati tek nakon 1 do 2 tjedna primjene lijeka.



Slika 4. Od propisane doze do farmakološkog učinka lijeka djelovanjem brojnih čimbenika dolazi do značajnih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih varijabilnosti (preuzeto iz Hiemke i sur., 2018).

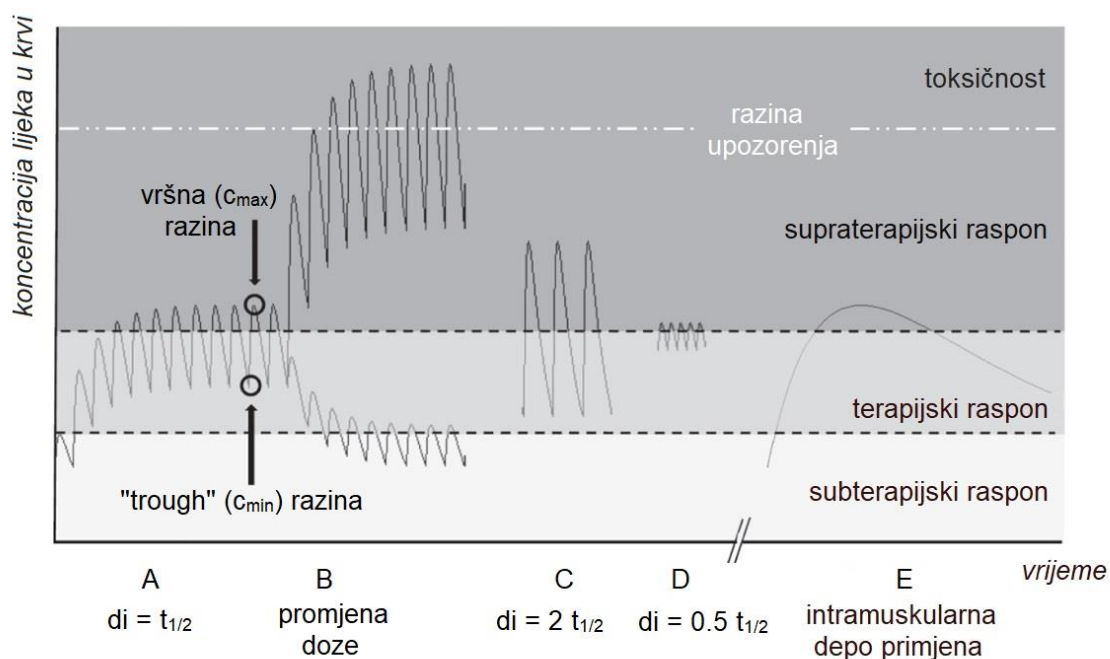
Terapijsko praćenje koncentracije lijeka (TDM, *engl.* therapeutic drug monitoring) odnosi se na točnu kvantifikaciju određenog lijeka u biološkim uzorcima kao što su krv, serum ili plazma u određenim vremenskim intervalima. Uz to, potrebna je farmakološka interpretacija dobivenih rezultata mjerenja. Početno je TDM uveden kako bi se poboljšao sigurnosni profil lijekova, a danas je osnovni alat „precizne medicine“ jer razmatra visoku interindividualnu varijabilnost farmakokinetike psihotropnih lijekova. Zbog toga, terapijsko praćenje lijeka sve se više koristi kao rutinski dio neuropsihofarmakoterapije.

Sustav izoenzima citokroma P450 (CYP 450) jedan je od glavnih izvora farmakokinetičke varijabilnosti neuropsihijatrijskih, ali i drugih lijekova. Drugi ključni čimbenik koji utječe na metabolizam i bioraspoloživost psihotropnih lijekova je istovremena primjena drugog lijeka koji potencijalno mogu „ometati“ liječenje. Lijekovi s inhibirajućim ili inducirajućim učinkom na enzime metabolizma i/ili transportere mogu dovesti do smanjenja ili povećanja koncentracije lijeka na ciljnim mjestima djelovanja unutar mozga.

1.2.1. Načela terapijskog praćenja koncentracije lijeka

Teorijski, koncentracija lijeka u uvjetima dinamičke ravnoteže/ravnotežnog stanja (*engl.* steady-state) u krvi postiže se kada je brzina unosa lijeka jednaka brzini gubitka lijeka. Praktično, to stanje se postiže nakon vremena koje iznosi otprilike 4-6 vremena polueliminacije lijeka ($t_{1/2}$) pod uvjetom da se ne mijenja doza (Slika 5). To znači da je stanje dinamičke ravnoteže za oralni oblik olanzapina, čiji $t_{1/2}$ prosječno iznosi 33 h, postignuto za otprilike tjedan dana primjene stalne doze. Iz praktičnih razloga prikladno vrijeme uzorkovanja krvi je neposredno prije unosa sljedeće jutarnje doze, tj. 24 sata nakon posljednjeg uzimanja lijeka, ako se lijek daje jednom dnevno ujutro. Ovo je standardni postupak za mjerenje minimalnih koncentracija lijeka u uvjetima ravnotežnog stanja (c_{min} , *engl.* trough concentration). Uzastopnom primjenom istih doza nastoji se održati stalna koncentracija u krvi koja je odgovorna za farmakološki učinak lijeka. Mjerenjem minimalne ravnotežne koncentracije olanzapina u krvi, za koju je dokazano da dobro korelira sa zauzećem ciljnih receptora u mozgu i kliničkim odgovorom, može se izbjeći predoziranje ili subdoziranje.

Depo formulacije antipsihotičnih lijekova prate različite farmakokinetičke obrasce od oralnih oblika (Slika 5). Koncentracija lijeka u krvi ovisit će o formulaciji, tj. o oslobađanju lijeka iz skladišta i stupnju eliminacije. Kod pacijenata koji primaju injekcije dugog djelovanja, krv se uzima neposredno prije sljedeće injekcije. Mjerenje se, naravno, može provesti u bilo koje vrijeme ako se uoče neočekivane nuspojave, pri čemu tako izmjerena koncentracija ne mora bi minimalna ravnotežna koncentracija, ali se za pravilno tumačenje rezultata mora znati raspored doziranja. $t_{1/2}$ intramuskularnog oblika, olanzapin-pamoata, iznosi 30 dana, a c_{min} se postiže za otprilike mjesec dana.



Slika 5. Krivulja ovisnosti koncentracije o vremenu nakon primjene oralnog i depo intramuskularnog preparata (preuzeto iz Hiemke i sur., 2018).

1.2.2. Terapijski referentni raspon

Terapijski referentni raspon definira se kao raspon koncentracija lijeka u krvi koji je okarakteriziran kombinacijom maksimalne učinkovitosti i prihvatljive sigurnosti lijeka u kliničkoj praksi. Donja granica terapijskog raspona predstavlja vrijednost ispod koje je malo vjerojatno da će primijenjeni lijek izazvati terapijski odgovor. S druge strane, gornja granica je vrijednost iznad koje je malo vjerojatno terapijsko poboljšanje, a određena je na temelju maksimalne učinkovitosti i povećanog rizika od nuspojava pod pretpostavkom da su nuspojave povezane s koncentracijom lijeka u organizmu. Za većinu lijekova, referentni rasponi su dobiveni iz studija s terapijskim učinkovitim dozama, a lijekovi su korišteni za primarnu indikaciju. Ipak, važno je znati da su terapijski referentni rasponi orijentacijski rasponi temeljeni na populaciji i da ne moraju nužno biti primjenjivi na sve bolesnike. Pojedini bolesnici mogu pokazati optimalan terapijski odgovor pri koncentraciji lijeka koja nije unutar terapijskog referentnog raspona. Psihofarmakoterapija može biti najbolje određena identifikacijom bolesnikove individualne terapijske koncentracije.

Treba naglasiti da je terapijski raspon općenito primjenjiv samo za primarnu indikaciju za koju se lijek propisuje ili za koju je odobren. Značajni nedostatak terapijskih referentnih raspona je da još nisu procijenjeni obzirom na dob pacijenata pa tako ne postoje posebni rasponi

za djecu, odrasle i starije osobe. U laboratorijskim izvješćima terapijski referentni intervali mogu biti izraženi u molarnoj ili masenoj koncentraciji. Vrijednosti dane u masenim jedinicama mogu se pretvoriti u molarne množenjem s faktorom pretvorbe (CF, *engl.* conversion factor) koji je dan za određeni lijek ($\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times \text{CF}$). Za olanzapin, preporučeni terapijski referentni interval se kreće od 20 do 80 ng/mL, odnosno od 64 do 256 nmol/L, što znači da faktor konverzije za olanzapin iznosi 3,20. Naravno, ove vrijednosti se odnose na „trough“ (C_{\min}) koncentracije izmjerene u uvjetima dinamičke ravnoteže.

1.2.3. Praktični aspekti

Laboratorijska razina upozorenja predstavlja „trough“ koncentraciju lijeka koja prelazi određenu razinu i kod koje se može očekivati znatno povećan rizik od nuspojava (ADR, *engl.* adverse drug reactions) koje koreliraju s koncentracijom lijeka u tijelu. Koncentracije lijeka iznad laboratorijskih razina upozorenja moraju odmah biti prijavljene kliničaru koji onda na temelju njih regulira dozu u skladu s kliničkom slikom bolesnika. U slučaju dobrog podnošenja visokih koncentracija lijeka, odluka o prilagodbi doze mora uzeti u obzir rizik od egzacerbacije ili relapsa bolesti. Ako nisu prisutni očiti štetni učinci poput jake sedacije i poremećaji motorike, promjenu doze svejedno treba temeljito razmotriti. Laboratorijska razina upozorenja za olanzapin iznosi 100 ng/mL (320 nmol/L). Razine olanzapina iznad ove zabilježene su u post-injekcijskom sindromu.

Koncentracija lijeka povezana s dozom (DRC, *engl.* dose-related drug concentration) računski se dobiva množenjem doze (mg/dan) s određenim faktorom. Pošto je faktor izražen kao srednja vrijednost uz dozvoljeno minimalno/maksimalno odstupanje ($X \pm \text{SD}$) dobiva se za dozu specifičan raspon s očekivanim „trough“ koncentracijom. Takav raspon obuhvaća koncentracije lijeka koje se očekuju kod 68% pacijenata u dobi od 18 do 65 godina s tjelesnom težinom od 70 kg i bez značajnih farmakokinetičkih komorbiditeta, istovremene primjene drugih lijekova, genetske abnormalnosti u metabolizmu lijeka i klinički značajnih nedostataka funkcije jetre i/ili bubrega. Faktor za izračun specifičnog raspona i srednje koncentracije olanzapina povezane s primijenjenom dnevnom dozom iznosi $1,85 \pm 0,65$.

Omjer metabolita i roditeljskog lijeka (MPR, *engl.* metabolite to parent drug ratio) dobije se dijeljenjem koncentracije glavnog metabolita s koncentracijom roditeljskog spoja. Taj podatak može biti odraz aktivnosti enzima uključenog u metabolizam određenog lijeka, što daje vrijedne informacije o statusu metabolizatora (npr. visoki MPR ukazuje na pojačanu enzimsku

aktivnost i na status ultrabrzog metabolizatora), suradljivosti bolesnika i interakcijama među lijekovima na farmakokinetičkoj razini. Stoga za neke lijekove može biti korisno pratiti i metabolit, iako s farmakološkog stajališta, on ne igra klinički značajnu ulogu. Olanzapin nema aktivnih metabolita. Omjer N-desmetilolanzapina i olanzapina iznosi 0,1-1,3.

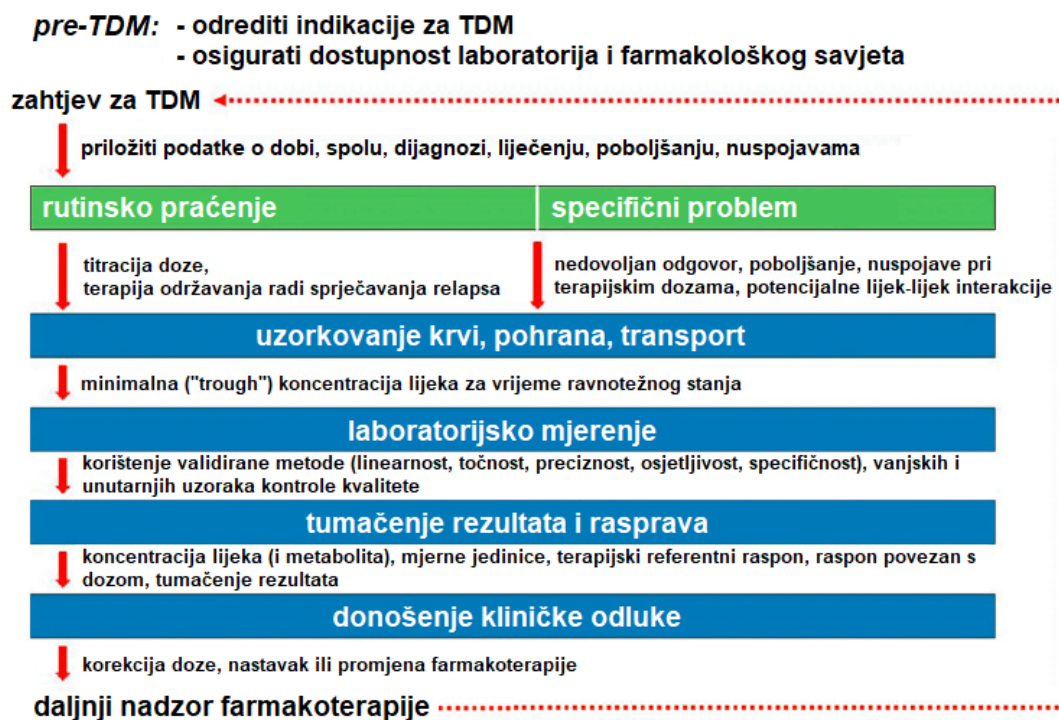
Omjer koncentracije lijeka i doze (C_{\min}/D , skraćeno C/D), izražen u (ng/mL)/mg, još je jedan parametar za analizu farmakokinetičkih abnormalnosti. Obrnuto je proporcionalan ukupnom klirensu lijeka. Budući da je omjer konstantan za pojedinog bolesnika, može se koristiti za procjenu dnevne doze potrebne za postizanje ciljne koncentracije lijeka u krvi.

1.2.4. Primjena i indikacije za praćenje koncentracije lijeka u krvi

Terapijsko praćenje koncentracije lijeka koristi se za usmjeravanje liječenja psihotropnim lijekovima s dobro definiranim ili uskim terapijskim referentnim rasponima. Prema zadanim smjernicama korisnost primjene terapijskog praćenja koncentracije lijeka temelji se na četiri razine preporuka. Najvišu razinu preporuke (razina 1) za terapijsko praćenje koncentracije lijeka u krvi imaju određeni stabilizatori raspoloženja poput litija, antidepresivi, antikonvulzivi te antipsihotici, uključujući i olanzapin. Kod tih lijekova titracija doze uglavnom je rutinski dio terapije (Slika 6). Kad je koncentracija lijeka unutar terapijskog referentnog raspona, očekuje se najveća vjerojatnost odgovora, odnosno remisije. Pri subterapijskim koncentracijama lijeka u krvi, odgovor na akutno liječenje je sličan placebo, a kod kroničnog liječenja postoji rizik od relapsa. Kod supratherapijskih koncentracija lijeka postoji opasnost od nepodnošljivosti lijeka, nuspojava ili izravne toksičnosti.

Terapijsko praćenje može se primijeniti u specifičnim indikacijama (Slika 6) za bilo koji lijek neovisno o razini preporuke, na primjer kod: nedostatka kliničkog poboljšanja tijekom uzimanja preporučene doze, relapsa unatoč liječenju, sumnje da se bolesnik ne pridržava terapije, vraćanja simptoma pri odgovarajućoj dozi, kombinirane terapije lijekovima koji su poznati po svom potencijalu interakcija, prisutnosti genskih polimorfizama u vezi s metabolizmom lijekova, pacijenata starijih od 65 godina, forenzičkih psihijatrijskih slučajeva, pacijenata s farmakokinetički relevantnim komorbiditetom (hepatična ili bubrežna insuficijencija, kardiovaskularna bolest), prebacivanja s originalnog pripravka na generički oblik lijeka i obratno. Preporuča se praćenje koncentracije lijeka i tijekom terapije održavanja kako bi se smanjila stopa relapsa i spriječila ponovna hospitalizacija bolesnika. Terapijsko praćenje koncentracije olanzapina je također korisno kada se peroralni oblik lijeka zamjenjuje

s depo formulacijom ili obrnuto. Veći broj mjerenja omogućuju bolje razumijevanje individualnog farmakokinetičkog profila bolesnika (Hiemke i sur., 2018).



Slika 6. Shematski prikaz terapijskog praćenja koncentracije lijeka (TDM-a) kao vodiča psihofarmakoterapije u svakodnevnoj kliničkoj praksi (preuzeto iz Hiemke i sur., 2018).

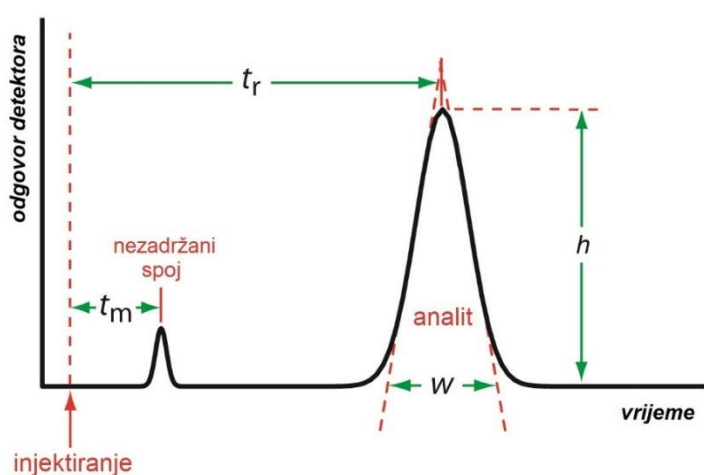
1.3. Primjena kromatografske metode u terapijskom praćenju koncentracije lijeka

U laboratorijskoj praksi analit (lijek) u uzorku (krv) treba odrediti u prisutnosti drugih tvari (metaboliti i druge sastavnice krvi). Biološki uzorci (puna krv, serum, plazma, urin) sadrže vrlo složen matriks s brojnim interferirajućim tvarima kao što su proteini i lipidi, a koncentracija analita (lijeka) kojeg se treba odrediti je uglavnom niska. Iz tih je razloga potrebna priprema uzorka prije same kromatografske analize. Najčešći načini obrade su precipitacija ili taloženje proteina (PPT, *engl.* protein precipitation), ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE, *engl.* liquid-liquid extraction) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, *engl.* solid phase extraction). Ekstrakcijskim postupcima, osim ukoncentriravanja i pročišćavanja analita, povećavaju se selektivnost i osjetljivost određivanja analita kromatografskom tehnikom. LLE često prethodi tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC, *engl.* high performance liquid chromatography) koja omogućuje odjeljivanje, a potom selektivno i osjetljivo određivanje analita u multikomponentnom uzorku kao što je krv ili neki drugi biološki uzorak.

Za pouzdanu identifikaciju supstanci, kromatografsko odjeljivanje kombinira se s raznim tipovima spektrometrijskih detektora u zajedničke automatizirane sustave (*engl.* hyphenated techniques). Kolonska tekućinska kromatografija, kod koje je mobilna faza tekućina, široko se primjenjuje u kliničkim toksikološkim laboratorijima kao rutinska metoda terapijskog praćenja farmakoterapije (Luterotti, 2014).

1.3.1. Temeljni principi kolonske kromatografije

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastavnice uzorka razdjeljuju između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Sastavnice uzorka otopljenog u mobilnoj fazi kreću se kroz kolonu unutar koje ulaze u interakcije sa stacionarnom fazom. Sastavnica koja pokazuje snažniju interakciju sa stacionarnom fazom dulje vrijeme će se provesti u stacionarnoj fazi i sporije putovati kroz kolonu. Vrijeme potrebno da analit od injektiranja uzorka na kolonu stigne do detektora koji se nalazi na izlazu kolone naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (t_R). Vrijeme koje je potrebno da spoj koji se uopće ne zadržava na stacionarnoj fazi ili čista mobilna faza prođu put od injektiranja do detektora označava se kao mrtvo vrijeme (t_M). Dodatkom novih količina eluenta (mobilne faze) dolazi do eluiranja, odnosno ispiranja odvojenih sastavnica uzorka s kolone. Prolaskom analita kroz kolonu dolazi do njihovog međusobnog odjeljivanja u vrpce ili zone. Ako se takve zone prilikom izlaska iz kolone uz pomoć odgovarajućeg detektora registriraju kao određeni signali tijekom vremena, dobivaju se kromatografski vršci, odnosno pikovi (*engl.* peak) koji čine kromatogram (Slika 7). Bazna linija na kromatogramu iz koje izlaze pikovi predstavlja signal



čiste mobilne faze na detektoru. Svaki pik definiran je visinom koja predstavlja jačinu signala detektora i površinom koja je u korelaciji s količinom analita (Mandić, 2018).

Slika 7. Prikaz kromatograma s odgovarajućim veličinama (preuzeto

[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography), pristupljeno 29.6.2018.)

Širenje zona uzduž kolone posljedica je kinetičkog efekta te predstavlja gubitak djelotvornosti kolone. Dakle, djelotvornost kromatografske kolone odnosi se na stupanj širenja kromatografskih zona, odnosno pikova. Manji promjer zrna punila i uža kolona pridonose većoj djelotvornosti kolone (Mandić, 2018). Povišenjem temperature opadaju vremena zadržavanja te se postiže brže eluiranje s kolone (povećava se protok, a smanjuje viskoznost mobilne faze), ali je separacija manje učinkovita. Zbog toga je potrebno naći optimalnu radnu temperaturu. Strogo kontrolirana i stalna temperatura važan je preduvjet za valjane usporedbe i analize (Luterotti, 2014).

1.3.2. Osnovni pojmovi i teorijska pozadina

Jedan od temeljnih i praktičnih pokazatelja kromatografskih odjeljivanja je koeficijent razdiobe (K) koji predstavlja omjer ravnotežnih koncentracija određenog analita u stacionarnoj (c_s) i u mobilnoj fazi (c_m). Definira se još kao ravnotežna konstanta reakcije razdiobe analita između mobilne i stacionarne faze. Veća vrijednost K ukazuje na jače zadržavanje otopljene tvari na stacionarnoj fazi. Što se sastavnice uzorka više razlikuju po vrijednostima K , to se one zaustavljaju na različitim mjestima nepokretne faze i bolje međusobno odjeljuju.

Faktor zadržavanja ili faktor kapaciteta (k') opisuje brzinu gibanja pojedinog analita. Određuje se iz kromatograma (preko t_M i t_R) i obično iznosi između 1 i 5. Ako je $k' < 1$, sastojci se eluiraju prebrzo (t_R je jednak t_M). Ako je $k' > 20$, vremena zadržavanja su preduga. U tekućinskoj kromatografiji optimalan k' se postiže mijenjanjem sastava mobilne faze.

Koeficijent selektivnosti (α) pokazuje odnos brzina gibanja dvaju analita za određenu kolonu. Izražava se kao omjer njihovih koeficijenata raspodjele (K) ili faktora retencije (k'). Za dobro razdvajanje dvaju analita nužno je da se njihove brzine gibanja dovoljno razlikuju, a to se postiže optimalnim sastavom mobilne i stacionarne faze te optimalnom temperaturom kolone.

Razlučivanje pikova ili kromatografska rezolucija (R_s) karakterizira selektivnost cijelog sustava. Računa se korištenjem baznih širina i retencijskih vremena dvaju pikova te ukazuje na sposobnost kromatografske kolone da odvoji dva analita. Za kvantifikaciju pomoću površine pika nužno je potpuno odjeljivanje sastojaka uzorka uz $R_s > 1,5$. Da bi se postiglo efikasno razlučivanje pikova, potrebno je naći optimalne vrijednosti k' , odnosno α . U tekućinskoj kromatografiji dobrom razlučivanju pridonosi čvrsti nosač malih čestica.

Teorija tavana temelji se na konceptu pojedinačnih koraka razdiobe na koloni koja je definirana brojem i visinom teorijskih tavana, odnosno ploča. U svakom tavanu dolazi do uravnoteženja u razdiobi kromatografiranih sastavnica između stacionarne i mobilne faze i do prijelaza iz jednog koraka odjeljivanja u sljedeći. Broj i visina teorijskih tavana karakteriziraju djelotvornost kolone. Uz manju visinu i veći broj teorijskih tavana, veća je djelotvornost kolone i bolja rezolucija. Treba imati na umu da vrijeme zadržavanja izravno raste s brojem teorijskih tavana. Visina tavana pod utjecajem je brzine protoka mobilne faze, veličine čestica punila kolone, viskoznosti faza i difuzijskih koeficijenata (Luterotti, 2014).

1.3.3. Načini izvedbe kromatografske analize

Ispravnu kvantitativnu kromatografsku analizu moguće je provesti samo uz odgovarajuće standarde. Pod unutarnjim standardom (IS, *engl.* internal standard) podrazumijeva se spoj poznate koncentracije koji se dodaje u nepoznati uzorak (i u kalibracijske i kontrolne uzorke) i koji je strukturno i po fizikalno-kemijskim svojstvima srodan analitu te ne smije biti uobičajeni sastojak uzorka koji se mjeri. Pretpostavka je da će eventualni gubici analita nastali tijekom pripreme ili analize zbog sličnih svojstava biti isti i kod unutarnjeg standarda. Iz omjera površina pika analita i unutarnjeg standarda izrađuje se kalibracijska krivulja koja služi za izračun nepoznatih koncentracija (Mandić, 2018). Vanjski standard je najčešće sam analit iz kojeg se priređuju standardne otopine poznate koncentracije koje se mjere odvojeno od nepoznatog uzorka, ali pod jednakim eksperimentalnim uvjetima kao i nepoznati uzorak te služe u svrhu postavljanja kalibracijske krivulje (Luterotti, 2014). Rezultati površine pikova dobivene analizom nepoznatog uzorka se pomoću kalibracijske krivulje preračunavaju u koncentraciju analita. Prilikom kvantitativne analize preporuča se korištenje kontrolnih uzoraka poznate koncentracije koji služe za provjeru kalibracijskog pravca (Mandić, 2018).

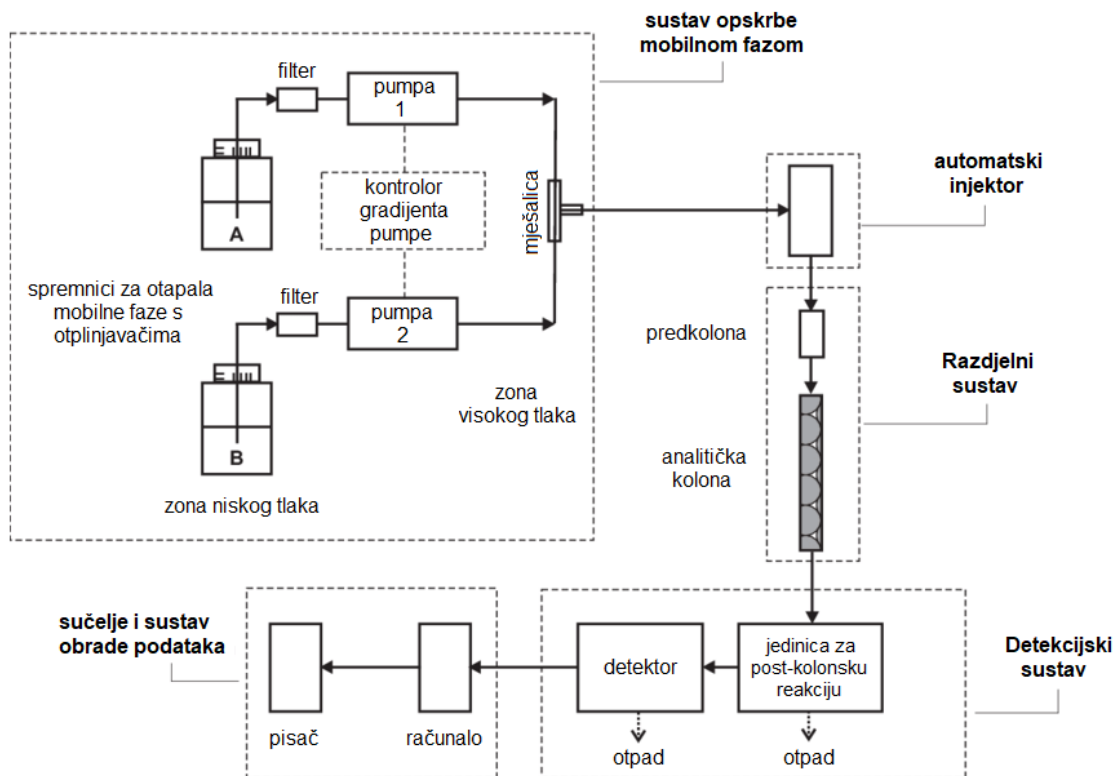
Valja razlikovati izokratno od gradijentnog eluiranja. Izokratno eluiranje odnosi se na ispiranje tijekom kojega se ne mijenja sastav eluensa, tj. mobilne faze. Bolje odjeljivanje postiže se primjenom gradijentnog ispiranja tijekom kojeg se sastav mobilne faze stalno mijenja. Ukoliko izokratno eluiranje ne dovodi do željenog odjeljivanja, primjenjuje se gradijentno ispiranje. Da bi se promijenila polarnost analita i povećala osjetljivost dokazivanja, moguće je analit derivatizirati (Luterotti, 2014).

1.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPLC je visoko učinkovita razdjelna kromatografija koja se u 75% primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza (RPLC, *engl.* reverse-phase liquid chromatography) u kojoj je stacionarna faza nepolarna, a mobilna faza manje nepolarna ili polarna. RPLC omogućuje gradijentnu eluciju (povećanjem udjela organskog otapala), ali zahtijeva injektiranje uzorka u otapalo kompatibilno s vodom (Luterotti, 2014).

Osnovni konstrukcijski dijelovi HPLC sustava su: spremnici za otapala mobilne faze, otplinjavač (*engl.* degasser), pumpe, automatski injektor (*engl.* autosampler), po mogućnosti predkolona (*engl.* guard column), kolona za odjeljivanje i detektori (Slika 8). Mobilna faza, odnosno organska otapala se nalaze u spremnicima i sadržavaju filtere koji uklanjaju kristale i druge nečistoće. Otapala koja se koriste kao mobilna faza trebaju biti visoke HPLC čistoće i potrebno ih je osloboditi mjehurića otopljenih plinova pomoću otplinjavača. Pumpe omogućuju prijenos mobilne faze kroz kolonu pod visokim tlakom (do 15 MPa) i stalnom brzinom (0,1-10 mL/min). Obično se koriste recipročne pumpe s dva klipa koji naizmjenično uvlače eluens. Sustav se može programirati tako da koristi različite omjere sastojaka mobilne faze u određenom trenutku. Na taj način se mijenja sastav eluensa. Kod gradijentne elucije sastojci mobilne faze prije ulaska u sustav homogeniziraju se u gradijentnoj miješalici (*engl.* gradient mixer) pa treba voditi računa o mogućnosti miješanja različitih sastojaka i viskoznosti mobilne faze. Unošenje uzorka u sustav obavlja automatski injektor s ventilom i tzv. petljom (*engl.* loop). Petlja je kapilara određenog volumena u koju se unosi uzorak. Kada je ventil u položaju za punjenje, unaprijed određen volumen uzorka unese se u petlju. Nakon toga se ventil okreće u položaj za injektiranje i protok eluensa ispire uzorak iz petlje prema koloni. Tako se osigurava neprekinuti tok mobilne faze prilikom unošenja uzorka u sustav. HPLC kolone izrađene su od nehrđajućeg čelika i dostupne su u vrlo velikom broju različitih kombinacija punila, promjera i dužina. U RPLC najčešće se koristi silika-gel derivatiziran s alkilnim skupina kao što su oktadecil (C₁₈), oktil (C₈), fenil (C₆) ili butil (C₄), koji čine nepolarnu stacionarnu fazu i snažno zadržavaju nepolarne tvari. Uobičajeni promjer zrna punila iznosi od 1,8 do 10 µm, promjer kolone 1-5 mm i dužina kolone 5-30 cm. Kolone užeg promjera i manjeg promjera čestica punila su veće djelotvornosti. Daju oštrije pikove, omogućuju brže razdvajanje i zahtijevaju manje volumene eluensa, ali postižu i puno veće tlakove, prema tome pumpe i ostali elementi sustava moraju biti predviđeni za takve uvjete. Obično se u sustav prije glavne analitičke kolone stavljaju kratke predkolone s identičnom stacionarnom fazom kao i glavna kolona čija je uloga

smanjiti kontaminaciju glavne kolone i produžiti joj vijek trajanja. Kolone su smještene u termostatirani prostor, tzv. pećnicu, i za dobru ponovljivost retencijskih vremena analita važno je održavanje stalne temperature tijekom analize.



Slika 8. Shematski prikaz HPLC sustava s osnovnim konstrukcijskim dijelovima (preuzeto s https://www.researchgate.net/Schematic-diagram-of-a-typical-HPLC-or-HPIC-set-up-with-a-binary-gradient-mobile-phase_fig1_227934976, pristupljeno 29.6.2018.)

Analiti se detektiraju prilikom njihovog eluiranja s kolone. Izlaz kolone spaja se s detektorom, a prolaskom analita nošenog mobilnom fazom kroz detektor nastaje signal koji se mjeri. Kod većine detektora mjerenje se provodi prolaskom kroz protočnu kivetu i detekcija nije destruktivna, tako da se detektori mogu povezivati u seriju radi dobivanje veće količine informacija o analitima. Najčešće se koriste detektori apsorbancije (UV/VIS, PDA detektori), detektori fluorescencije, elektrokemijski detektori i maseni spektrometar (MS). Detektori s nizom dioda (PDA, *engl.* photo diode array) omogućuju istodobno snimanje apsorbancije analita na velikom broju valnih duljina, tj. omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/VIS području (190-700 nm). Kod rada s detektorom apsorbancije nužna je uporaba eluensa koji ne apsorbiraju svjetlost u mjernom području (Mandić, 2018).

1.4. Validacija bioanalitičke metode

U kliničkoj toksikologiji, kao i u svim ostalim biomedicinskim područjima, važno je dokazati da metode korištene u kliničkoj praksi imaju značajke koje garantiraju pouzdane rezultate. Taj postupak dokazivanja poznat je kao validacija bioanalitičke metode. Općenito, validacija bioanalitičke metode provodi se kod razvoja i uvođenja nove metode u rutinsku primjenu, kod poboljšanja ili prilagodbe postojeće metode i kod prenošenja metode u drugi laboratorij. Prilikom validacije, dobiveni podaci moraju biti u skladu sa znanstvenim standardima i trebaju zadovoljiti zahtjeve službenih tijela, za razliku od verifikacije, gdje se podaci uspoređuju s kriterijima koje navodi proizvođač metode. Validacija kliničkih metoda treba biti u skladu s dobrom laboratorijskom praksom (GLP, *engl.* good laboratory practice). (Luterotti i Bičanić, 2013).

Pouzdanost analitičkih nalaza od velike je važnosti u terapijskom praćenju koncentracije lijeka te je preduvjet za točnu interpretaciju toksikoloških nalaza. Nepouzdana rezultati mogu dovesti do pogrešne terapije za bolesnika. Zato je važno da svojstva i sposobnosti metode budu na ispravan način ispitani i validirani.

1.4.1. Validacijski parametri

Koji će se validacijski parametri ispitivati tijekom postupka validacije i s kojim kriterijima prihvatljivosti utvrđuje se ovisno o namjeni metode. Tako validacija „*in-house*“ kvantitativnih postupaka treba obuhvatiti procjenu: točnosti (biasa i preciznosti), analitičke specifičnosti/selektivnosti, analitičke osjetljivosti (granice detekcije i granice kvantifikacije), linearnosti (i modela kalibracije), stabilnosti, referentnog intervala i analitičke točnosti (*engl.* recovery) metode (Peters i Maurer, 2001). Definicije i načini ispitivanja nekih validacijskih parametara razlikuju se između raznih organizacija i publikacija koje se bave analitičkom terminologijom i validacijom (Luterotti i Bičanić, 2013). Preporuča se korištenje jednog od navedenih terminoloških sustava za potrebe validacije uz moguće male izmjene tamo gdje su potrebne (Peters i Maurer, 2001).

1.4.1.1. Selektivnost

Selektivnost je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje i izmjeri analit u prisutnosti ostalih komponenata uzorka, kao što su metaboliti, onečišćenja, razgradni produkti i druge sastavnice matriksa. Pojam specifičnosti često se zamjenjuje sa selektivnošću, iako se u užem

smislu specifičnost odnosi na metode koje daju odgovor samo za jedan analit, dok se selektivnost odnosi na metode koje daju odgovor za niz kemijskih entiteta, koji se mogu ili ne moraju razlikovati. Metoda selektivna za više analita trebala bi moći međusobno razlikovati analite od interesa i razlikovati ih od matriksa. Selektivnost metode utvrđuje se na temelju izostanka odgovora/signala analita u slijepom (*engl.* blank) matriksu, odnosno slijepom uzorku. U kromatografskim tehnikama, analitičku selektivnost na temelju čistoće eluiranog pika moguće je dodatno procijeniti uz pomoć detektora koji rade na različitim principima. Na primjer, danas se „on-line“ primjenom UV/VIS ili PDA detektora ili masenog spektrometra dobivaju spektri tijekom eluiranja analita koji pokazuju je li pik čist ili nije. Ako se neka od sastavnica uzorka eluira neposredno u blizini pika analita, selektivnost metode može se procijeniti računanjem parametra kromatografskog razlučivanja (R_s).

1.4.1.2. Kalibracijski model i linearnost

Izbor prikladnog kalibracijskog modela neophodan je za pouzdanu kvantifikaciju. Stoga se mora ispitati odnos između koncentracije analita u uzorku i odgovora detektora. To se može napraviti analiziranjem kalibracijskih uzoraka i izradom grafa koji prikazuje ovisnost dobivenih odgovora o pripadajućim koncentracijama. Dobivena kalibracijska krivulja može se procijeniti matematičkim metodama i na temelju grafičkog prikaza. Za linearne modele najčešće se koristi metoda najmanjih kvadrata. Jednom kad se ustanovi kalibracijski model, kalibracijske krivulje za druga validacijska ispitivanja i za rutinsku analizu mogu se pripremiti s manjim brojem koncentracijskih razina i s manje ili bez replikata (Peters i Maurer, 2001).

Linearnost je sposobnost analitičke metode da daje rezultate ispitivanja proporcionalne koncentraciji analita unutar zadanog radnog (kalibracijskog) područja bez dodatnog razrjeđivanja uzorka. Linearno područje se procjenjuje vizualno i putem matematičke (statističke) metode. Slučajna raspodjela oko pravca potvrđuje linearnost metode i postojanje povezanosti podataka ($r > 0,99$, odsječak na osi y treba biti $\leq 2\%$ signala ciljane koncentracije). Pravac treba imati nagib blizu 1, s odsječkom blizu 0.

1.4.1.3. Točnost

Na točnost metode utječu komponente sustavne (bias) i slučajne (preciznost) pogreške. Sustavna pogreška nastaje zbog neispravnosti mjernog instrumenta, izbora pogrešne metode mjerenja ili njenog pogrešnog izvođenja i odnosi se na mjerno odstupanje (*engl.* bias), dok se slučajna pogreška javlja zbog nepoznatih i nepredvidivih promjena uvjeta okoline ili unutar

instrumenta tijekom procesa mjerenja i u vezi je s preciznošću. Treba napomenuti da se točnost često koristi za opisivanje samo sustavne komponente pogrešaka, tj. kao bias koji predstavlja razliku između srednje vrijednosti rezultata dobivenih ispitivanom metodom i prihvaćene referentne vrijednosti, a izražava se kao postotno odstupanje od prihvaćene referentne vrijednosti. Izrazom istinitost (*engl.* trueness) definira se odstupanje srednje vrijednosti velikog niza rezultata mjerenja od prihvaćene referentne vrijednosti. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (*engl.* recovery) koji se računa iz omjera srednje izmjerene vrijednosti i stvarne vrijednosti analita u uzorku te se izražava kao postotak.

1.4.1.4. Preciznost

Preciznost je blizina slaganja ili stupanj raspršenja između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod unaprijed određenim propisanim uvjetima. Može se razmatrati kao ponovljivost (preciznost u seriji) i međupreciznost (preciznost iz dana u dan). Preciznost se obično izražava kao nepreciznost i računa se kao standardna devijacija rezultata ispitivanja. Veća vrijednost standardne devijacije ukazuje na manju preciznost metode. Ponovljivost (*engl.* repeatability) se izražava kao preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala, tj. isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju. Međupreciznost ili intermedijarna preciznost (*engl.* intermediate precision) poznata je i kao preciznost između dana (*engl.* between-day precision), preciznost između testova (*engl.* inter-assay precision), preciznost između serija (*engl.* between-run precision). Obuhvaća varijacije unutar istog laboratorija koje potječu od različitih dana u kojima se provodi analiza. Tu spadaju očekivane promjene tijekom duljeg vremenskog perioda kao što su ponovljene kalibracije s različitim kalibratorima, različiti analitičari, različita oprema itd.

1.4.1.5. Analitička osjetljivost

Donja granica kvantifikacije (LOQ ili LLOQ, *engl.* lower limit of quantification) je najniža količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s prikladnom preciznošću i točnošću (biasom). Postoje različiti pristupi određivanja LLOQ. Vjerojatno najpraktičniji pristup određivanja LLOQ je onaj prema preciznosti i točnosti (bias) najnižeg koncentracijskog nivoa tj. najniže točke kalibracijske krivulje. Kod kromatografskih metoda LLOQ se definira kao injektirana količina koja rezultira pikom koji je najmanje 10 puta viši od šuma bazne linije, a izražava se omjerom ($S/N \geq 10$, *engl.* signal to noise ratio). LLOQ se može odrediti i na

temelju standardne devijacije signala slijepog uzoraka. Posljednji pristup je određivanje LLOQ na temelju specifične kalibracijske krivulje u rasponu donje granice kvantifikacije.

Kvantifikacija ispod LLOQ nije prihvatljiva. Prema tome, ispod te vrijednosti metoda može proizvesti samo semi-kvantitativne ili kvalitativne podatke. Međutim, još uvijek je važno znati granicu detekcije (LOD, *engl.* limit of detection) metode. To je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno kvantificirati kao točno određena vrijednost. Još se definira kao najniža koncentracija analita u uzorku koju bioanalitička metoda može pouzdano razlikovati od pozadinskog šuma. U kromatografiji granica detekcije je injektirana količina koja rezultira pikom koji je najmanje 2-3 puta viši od šuma bazne linije ($S/N = 3$). Granica detekcije određuje se tako da se srednjoj vrijednosti slijepe probe doda trostruka vrijednost standardne devijacije. Ako se upotrebljava pristup kalibracijske krivulje za određivanje LOD, moraju se koristiti samo kalibratori koji sadrže analit u rasponu LOD.

1.4.1.6. Stabilnost

Stabilnost se može definirati kao kemijska stabilnost analita u danom matriksu pod određenim uvjetima tijekom zadanog vremenskog intervala. Stabilnost lijeka u biološkoj tekućini funkcija je uvjeta čuvanja, kemijskih svojstava lijeka, naravi matriksa i laboratorijskog posuđa. Stabilnost analita tijekom cijelog analitičkog postupka preduvjet je za pouzdanu kvantifikaciju. Stoga, potpuna validacija metode mora uključivati ispitivanje stabilnosti za različite faze analize, uključujući pohranu prije analize. Dugotrajna stabilnost u matriksu uzorka treba biti utvrđena u uvjetima pohrane, tj. u istom kemijskom posuđu, na istoj temperaturi i tijekom vremena za koje se očekuje stabilna pohrana autentičnih uzorka. Potrebno je ispitati i stabilnost pri smrzavanju/odmrzavanju. Budući da se uzorci često smrzavaju i odmrzavaju, npr. za ponavljanje analiza, stabilnost analita tijekom nekoliko ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja (najmanje 3) treba također procijeniti. Kao kriteriji prihvatljivosti uzimaju se dozvoljena odstupanja za preciznost i točnost.

1.4.2. Procjena referentnih intervala

Ako su referentni intervali preuzeti iz literature, potrebno je provesti verificiranje referentnog intervala ispitivanjem najmanje 20 ispitanika populacije za koju će se primjenjivati po kategoriji (dob, spol i dr.)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Antipsihotici su lijekovi koji ublažuju psihotične simptome u različitim stanjima, prvenstveno kod bipolarnog poremećaja i različitih vrsta psihoza koje uključuju i shizofreniju. Iako se njima ne mogu u potpunosti izliječiti ove bolesti, antipsihotici su smanjili potrebu za dugotrajnom hospitalizacijom i omogućili normalno svakodnevno funkcioniranje bolesnika. Danas se najviše koriste atipični antipsihotici, čiji je predstavnik i olanzapin.

Olanzapin je jedan od lijekova kojima je potrebno terapijsko praćenje lijeka u svrhu individualizacije terapije i određivanja režima doziranja.

Lijekovi, pa i olanzapin, određuju se u biološkim uzorcima koji sadrže kompleksni matriks. Stoga je potrebno razviti metodu kojom će se analit od interesa učinkovito pročistiti i ukoncentrirati te zatim kvantificirati. U praksi se analit ekstrahira, a zatim kvantificira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti kombiniranom sa spektrofotometrijskim detektorom.

Cilj ovog rada je validirati, odnosno ispitati razvijenu metodu za određivanje olanzapina u serumu metodom HPLC-DAD i dokazati da se metodom dobivaju pouzdani rezultati analize. Validacija *in-house* metode uključuje ispitivanje točnosti (biasa i preciznosti), analitičke specifičnosti/selektivnosti, analitičke osjetljivosti (granice detekcije i granice kvantifikacije), linearnosti (i modela kalibracije), referentnog intervala i analitičkog povrata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

- uzorci seruma bolesnika sa odjela psihijatrije KBC-a Zagreb i Klinike za psihijatriju „Vrapče“ (dostavljeni u laboratorij kao puna krv)
- komercijalni ClinCal[®] - Calibrator FOR PSYCHOACTIVE DRUGS TDM3 (RECIPE, Njemačka) liofilizirani kalibrator (vanjski standard), baziran na humanom serumu (REF 40013, LOT 446), olanzapin 252 nmol/L
- komercijalni ClinChek[®] - Control FOR PSYCHOACTIVE DRUGS TDM3 (RECIPE, Njemačka) liofilizirani uzorci za unutarnju kontrolu kvalitete sustava, baziran na ljudskom serumu (REF 8708, LOT 546), u dva koncentracijska nivoa: razina 1 (LI, *engl.* level 1) olanzapina 67,3 (53,8 - 80,7) nmol/L i razina 2 (LII, *engl.* level 2) olanzapin 203 (162 - 243) nmol/L
- „spajkani“ uzorci za unutarnju kontrolu kvalitete (humani serum bez lijekova obogaćena sa standardnom otopinom olanzapina) u dva koncentracijska nivoa: 10 ng/mL (32,0 nmol/L) i 100 ng/mL (320 nmol/L), CF za olanzapin 3,20
- slijepa proba (serum bolesnika bez olanzapina)

3.1.2. Oprema

Za analizu je korišten HPLC-2 Prominence SHIMAZDU sustav koji sadrži:

- 2x pumpe (LC-20AD)
- otplinjavač (DGU-20A₃)
- autoinjektor (SIL-20AC_{HT}),
- pećnicu (CTO-20AC),
- spektrofotometrijski detektor s diodnim nizom (SPD-M20A),
- kontrolnu jedinicu (CBM-20A).

Sustav je povezan s računalom i pisačem. Za prikupljanje i obradu podataka iz detektora korišten je EZStart 7.4 i vlastita baza UV kromatograma u rasponu od 190 do 370 nm.

3.1.3. Kemikalije

- olanzapin (Zypadhera[®] 210 mg) – depo preparat za intramuskularnu injekciju
- kloramfenikol (Sigma-C6455) – interni standard (IS)
- dimetilsulfoksid (DMSO) – otapalo
- čvrsta tvar natrij-karbonat (Aldrich Chemical Company, Inc., USA)
- čvrsta tvar amonij-acetat (Merck KgaA, Njemačka)
- octena kiselina za podešavanje pufera
- pročišćena voda (HPLC čistoće < 0,060 µS/cm)
- metanol (Merck KgaA, Njemačka)
- acetonitril (Merck KgaA, Njemačka)
- *n*-heksan (Merck KgaA, Njemačka)
- etilacetat (Merck KgaA, Njemačka)

3.1.4. Laboratorijski pribor

- staklene epruvete s navojem za ekstrakciju
- konusne staklene epruvete
- vialice (bočice za iniciranje)
- automatske pipete (Eppendorf)
- staklene pipete i propipeta
- vodoravna tresilica PROMAX 1020 (Helidolph)
- centrifuga ROTOFIX 32 (Hettich Zentrifugen)
- vorteks
- vodena kupelj pri 37°C (Precitherm PFV)
- analitička vaga OHAUS
- digestor i sustav za uparavanje
- odmjerne tikvice, staklene čaše
- tikvica za odsisavanje i metalna kopča
- celulozni filter papir s porama 0,45 µm (Millipore HAWP04700)
- indikatorski pH papirići
- pH-metar (Mettler Toledo MP 220)

3.2. Metode

3.2.1. Postupanje s uzorcima bolesnika

Krv je uzorkovana u epruvete bez aditiva i antikoagulansa neposredno prije uzimanja iduće doze, tjedan dana nakon stabilnog dnevnog doziranja za peroralnu primjenu, odnosno neposredno prije sljedeće injekcije kod bolesnika na depo preparatu olanzapina. Prilikom transporta u laboratorij, uzorci nisu bili smrznuti. Odmah pri dolasku u laboratorij, krv je centrifugirana 5 min pri 3500 okretaja/min na sobnoj temperaturi kako bi se dobio serum. Uzorci seruma čuvani su u hladnjaku na +4°C ako je analiza bila planirana unutar 24 h. Uzorci seruma koji nisu analizirani unutar 24 h, bili su smrznuti, tj. pohranjeni na -20°C u hladnoj komori.

3.2.2. Ekstrakcija uzoraka

Korištena je ekstrakcija tekuće-tekuće kako bi se izdvojila ukupna frakcija olanzapina. 500 µL seruma/kontrolnog uzorka/kalibratora, 200 µL karbonatnog pufera i 50 µL radne otopine IS kloramfenikola otpipetira se u epruvete za ekstrakciju te se kratko vorteksira. Zatim se dodaje 2,5 mL ekstrakcijskog otapala etilacetat : *n*-heksan = 1:1. Ekstrakcija se odvija u vodoravnom položaju na tresilici 15 min pri brzini 8. Nakon toga, uzorci se centrifugiraju na 3500 o/min kroz 5 min, pri sobnoj temperaturi. 2 mL gornjeg organskog sloja koji sadrži olanzapin prenese se pomoću propipete i staklene pipete u čistu staklenu konusnu epruvetu od 10 mL za sušenje te se u vodenoj kupelji (37°C) pomoću struje zraka upari do suha. Suhi ostatak se resuspendira u 150 µL mješavine amonij-acetatni pufer : mobilna faza (metanol i acetonitril u omjeru 1:1) : karbonatni pufer = 1:1:1 uz jako vorteksiranje te se svih 150 µL otpipetira u vialice od 200 µL.

Priprema pufera (0,1M karbonatni, pH 10,9) za ekstrakciju: odvagati 2,65 g Na₂CO₃ te otopiti u 200 mL pročišćene vode za HPLC te prebaciti u odmjernu tikvicu od 250 mL i nadopuniti vodom do oznake. pH bi trebao biti oko 10,9 bez podešavanja. Provjeriti univerzalnim indikatorskim pH papirićem za alkalno područje.

Priprema matične otopine IS kloramfenikola: 10 mg kloramfenikola: odvaži se i otopi u metanolu u odmjernoj tikvici od 10 mL da se dobije koncentracija 1 mg/mL. Čuva se na -20°C, a valjanost je godinu dana.

Priprema radne otopine IS kloramfenikola: 50 μ L pripremljene matične otopine u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti do oznake s pročišćenom vodom za HPLC. Tako pripremljena radna otopina (5 μ g/mL) koristi se prilikom ekstrakcije, inače se čuva na +4°C, a valjanost je 6 mjeseci.

3.2.3. Kromatografski uvjeti

- analitička kolona InterSustain™ C18 kolona dimenzija 3 μ , 4.6 x 50mm (Gl Sciences Inc., Japan) bez predkolona, grijana u pećnici na 25°C,
- pumpa A (amonij-acetatni pufer), pumpa B (acetonitril : metanol = 1:1), tlak 800 psi
- program gradijentnog protoka (1,0 mL/min) mobilne faze: početno pumpa B 0 %, pumpa A 100 %, zatim pumpa B 60 % linearno kroz 15 min, zatim 5 min pumpa B 0%, ukupno vrijeme analize 20 min
- spektrofotometrijski detektor s diodnim nizom (SPD-M20A) tijekom mjerenja snima spektar u UV području 190 - 370 nm; valna duljina za kvantitativno mjerenje olanzapina i IS kloramfenikola je 254 nm
- autoinjektor: temperatura hlađenja 10 °C, volumen iniciranja je 50 μ L pripremljenog uzorka

3.2.4. Priprema mobilne faze

Uz pomoć menzure odlije se 250 mL metanola i 250 mL acetonitrila u zatamnjenu bočicu od 500 mL kako bi se dobila mješavina metanola i acetonitrila u volumnom omjeru 1:1.

Priprema pufera (10 mM amonij-acetatni, pH 3,5) za mobilnu fazu: 0,77 g amonij-acetata otopi se u 700 mL pročišćene vode za HPLC, a pH se podesi ledenom octenom kiselinom do pH 3,5 uz pH-metar. Nadopuni se do 1 L pročišćenom vodom za HPLC te se pufer filtrira kroz celulozni filter pod vakuumom. Prelije se u tamnu bocu i čuva na +4°C do uporabe. Valjanost pufera je 6 mjeseci.

3.2.5. Priprema kalibratora i izrada kalibracijske krivulje

Komercijalni uzorak za kalibraciju priređen je prema uputi proizvođača. Nakon otapanja i stabilizacije uzorak za kalibraciju koristi se za analizu ili se razdijeli i pohrani prema uputama proizvođača. S kalibratorom se postupa na isti način kao i s uzorcima bolesnika. Pomoću računalnog programa napravljena je kalibracija u jednoj točki na temelju jedne koncentracije olanzapina (252 nmol/L) unutar raspona u kojem se očekuju prihvatljivi rezultati.

3.2.6. Priprema uzoraka za unutarnju kontrolu kvalitete:

Komercijalni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine (LI i LII) priređuju se prema uputi proizvođača. Nakon otapanja i stabilizacije pripremljeni kontrolni uzorci koriste se za analizu (isti postupak kao i za uzorke bolesnika) ili se razdijele u manje alikvote i pohrane u hladnjak na -20°C.

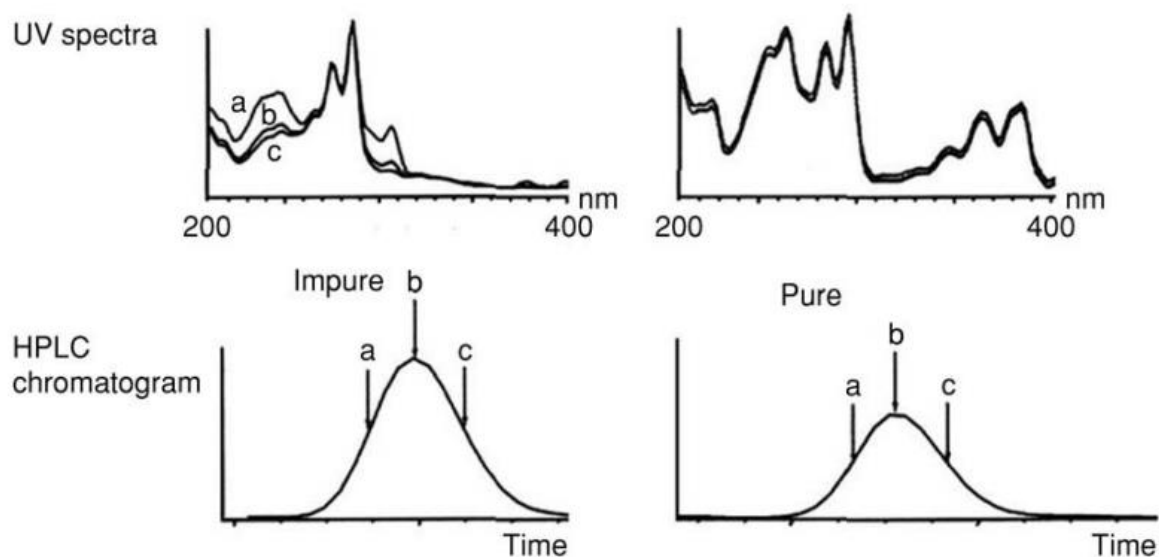
„Spajkani“ uzorci također su pripremljeni u dvije koncentracijske razine. Olanzapin (Zypadhera®) liofilizat za intramuskularnu primjenu otopljen je prema uputi proizvođača. Dio takve suspenzije je otopljen u DMSO kako bi se dobila standardna otopina olanzapina koncentracije 300 µg/mL. Iz te otopine prirede se dva razrjeđenja tj. koncentracijske razine olanzapina (obje izvan terapijskog raspona) tako da se serum bolesnika koji ne uzimaju olanzapin obogati olanzapinom. Jedna razina iznosi 10 ng/mL (32,0 nmol/L), a druga 100 ng/mL (320 nmol/L).

3.3. Ispitivanje validacijskih parametara

3.3.1. Selektivnost

Selektivnost metode da nedvojbeno izmjeri olanzapin je određena potvrdnim spektrofotometrijskim detektorom s diodnim nizom (SPD-M20A).

Oblik pika ne otkriva je li on homogen, pripada li samo jednoj sastavnici smjese ili više njih. Indeks čistoće pika (*engl.* peak purity index), uspoređivanje UV-spektara na različitim dijelovima kromatografskog pika (Slika 9) i indeks sličnosti (*engl.* similarity index) uspoređenih UV-spektara, praktični su aspekti pomoću kojih se može ispitati čistoća kromatografskog pika i na temelju kojih se zaključuje o selektivnosti HPLC metode.



Slika 9. Primjer ispitivanja čistoće pika usporedbom UV-spektara na različitim dijelovima kromatografskog pika. UV-spektri na 3 različita dijela (a, b, c) lijevog pika se razlikuju, što ukazuje na nehomogenost pika i koeluaciju više od jednog spoja. Desni pik je čist i pripada samo jednom analitu, što potvrđuje karakterističan UV-spektar.

3.3.2. Linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon

Kvantitativni odnos između koncentracije olanzapina i signala detektora ispitan je unutar cijelog raspona očekivanih koncentracija kako bi se odredile granice mjernog područja metode. Za procjenu linearnosti korišteno je 5 koncentracijskih razina standardne otopine olanzapina: 4,8 nmol/L, 48 nmol/L, 480 nmol/L, 960 nmol/L i 1920 nmol/L.

Priprema koncentracijskih nivoa za provjeru linearnosti kalibracijske krivulje:

1. otapanjem olanzapina nastaje suspenzija koncentracije 150 mg/mL
 $210 \text{ mg olanzapina (Zypadhera}^{\text{®}}) + 1,3 \text{ mL priloženog otapala} = 150 \text{ mg/mL}$
2. priprava matične otopine olanzapina koncentracije 300 µg/mL (MO olanzapina)
 $20 \text{ µL suspenzije olanzapina} + 19980 \text{ µL DMSO} = 300 \text{ µg/mL}$
3. razrjeđenje MO olanzapina (1:100) s DMSO
 $100 \text{ µL MO olanzapina} + 900 \text{ µL DMSO} = 30 \text{ µg/mL}$
 $100 \text{ µL [30 µg/mL]} + 900 \text{ µL DMSO} = 3 \text{ µg/mL}$
4. razrjeđenja u serumu:
 $800 \text{ µL [3 µg/mL]} + 3200 \text{ µL seruma} = 600 \text{ ng/mL} \times 3,20 = 1920 \text{ nmol/L}$
 $2000 \text{ µL [1920 nmol/L]} + 2000 \text{ µL seruma} = 960 \text{ nmol/L}$
 $1000 \text{ µL [960 nmol/L]} + 1000 \text{ µL seruma} = 480 \text{ nmol/L}$
 $200 \text{ µL [480 nmol/L]} + 1800 \text{ µL seruma} = 48 \text{ nmol/L}$
 $200 \text{ µL [48 nmol/L]} + 1800 \text{ µL seruma} = 4,8 \text{ nmol/L}$

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost površine kromatografskog pika olanzapina o zadanim koncentracijskim razinama olanzapina. Površina pika u korelaciji je sa signalom detektora. Korištene su samo površine olanzapina na 5 koncentracijskih razina, nisu uključene površine internog standarda. Linearnost je ispitana na temelju vizualne procjene i izračuna jednadžbe pravca ($y = ax + b$), odsječka na osi y (b) i nagiba pravca (a), te koeficijenta korelacije ($r \geq 0,990$). Podaci su dobiveni pomoću metode najmanjih kvadrata.

3.3.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Za procjenu obje granice analizirano je 10 slijepih proba (uzorci seruma bolesnika koji ne sadrže olanzapin). Granica detekcije određena je tako da je srednjoj vrijednosti analiziranih slijepih proba dodana trostruka vrijednost standardne devijacije ($S/N = 3$). LOQ je također određen pomoću standardne devijacije signala slijepih uzorka. Srednjoj vrijednosti slijepih proba dodana je deseterostruka vrijednost standardne devijacije ($S/N = 10$).

3.3.4. Preciznost

Za preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (međupreciznost) korišteni su komercijalni kontrolni uzorci na dvije koncentracijske razine, čije vrijednosti je odredio proizvođač. Razina I iznosi 67,3 nmol/L, a razina II 203 nmol/L.

Ponovljivost je ispitana analizom 2 uzorka različitih koncentracijskih razina (razina 1 i razina 2) u seriji od 10 ponovljenih mjerenja. Iz dobivenih rezultata mjerenja računaju se srednja vrijednost, standardna devijacija (SD, *engl.* standard deviation) i koeficijent varijacije (CV, *engl.* coefficient of variation). Izračunati CV deset uzastopnih određivanja mora biti unutar 10 % za koncentracije iznad donje granice kvantifikacije (LOQ).

Međupreciznost je određena analizom 2 kontrolna uzorka tijekom 12 dana. Također se računaju srednja vrijednost, SD i CV. Kriterij prihvatljivosti za srednje i visoke koncentracije uzima se CV do 10%.

3.3.5. Točnost

Za ispitivanje točnosti metode korištene su srednje vrijednosti kontrolnih uzoraka dobivene ispitivanjem međupreciznosti (preciznosti iz dana u dan). Tijekom ispitivanja međupreciznosti mjerene su 2 koncentracijske razine unutar 12 dana (67,3 i 203 nmol/L). Dodatne dvije koncentracijske razine ispitane su analizom još 2 uzorka obogaćena olanzapinom (32 i 320 nmol/L). Točnost je izražena pomoću *recovery* testa. Za obje koncentracijske razine, srednja vrijednost mjerenja bi trebala biti unutar granica od 85 – 115 % od nominalne (očekivane) koncentracije.

3.3.6. Referentni interval

Da bi se mogao primijeniti terapijski referentni raspon iz literature potrebno ga je verificirati. To je napravljeno ispitivanjem 58 bolesnika/ispitanika populacije za koju će se primjenjivati.

Mjerenje koncentracije olanzapina uključeno je i u vanjsku procjenu kvalitete, koja obuhvaća periodično mjerenje LGC PS15 Olanzapine uzoraka za vanjsku kontrolu kvalitete prema protokolu Therapeutic Drugs PT Scheme TM0361.

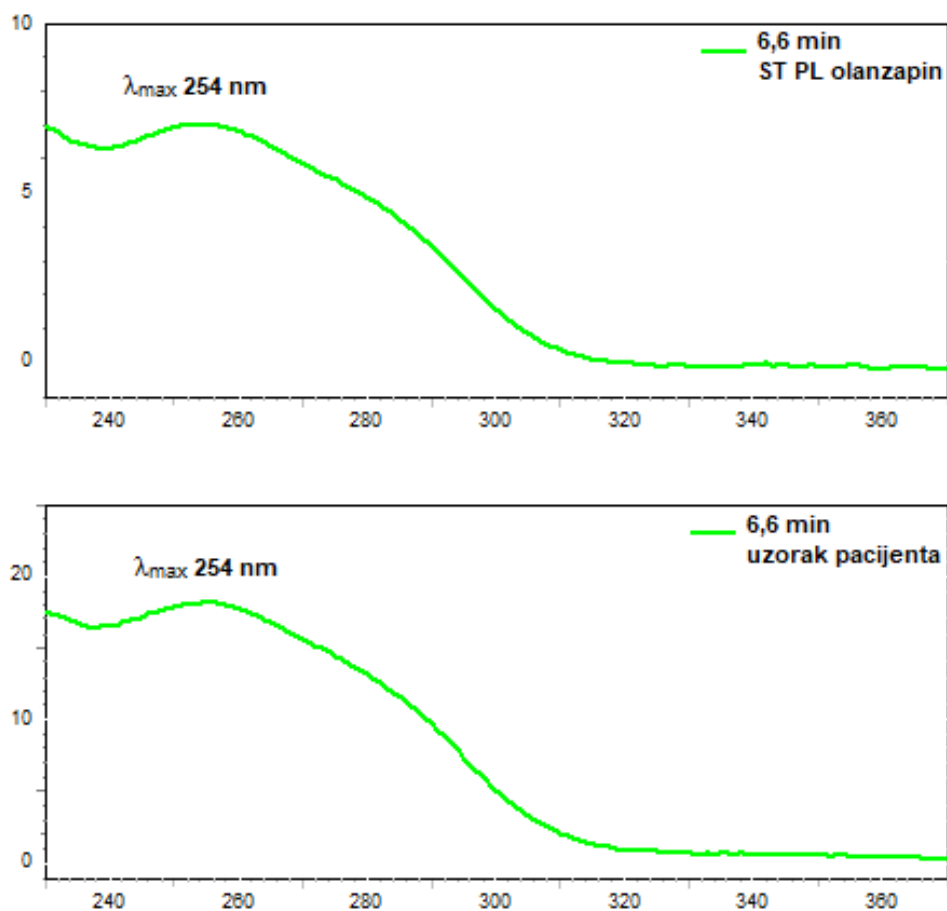
Za računanje parametara deskriptivne statistike korišten je program Excel, a za izradu histograma MedCalc. Kriteriji prihvatljivosti za ispitivanje validacijskih parametara preuzeti su iz internog dokumenta laboratorija koji je usklađen sa zahtjevima od strane „*Desirable Biological Variation Database specifications – Westgard*“ i European Medicines Agency (EMA).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Selektivnost

Na temelju uzorka mobilne faze u koji je dodan samo olanzapin određeno je retencijsko vrijeme olanzapina na 6,6 min te njegov karakterističan UV-spektar s maksimumom apsorpcije pri 254 nm (Slika 10). Retencijsko vrijeme olanzapina provjereno je analizom slijepog uzorka seruma (ekstrahiran prema opisanom protokolu) u koji je dodana određena količina standarda olanzapina. Pojavom pika nakon otprilike 6,6 min s identičnim UV-spektrom, potvrđeno je retencijsko vrijeme i UV-spektar olanzapina u serumu. Ti podaci spremljeni su u bazu podataka. Za IS kloramfenikol također je utvrđeno retencijsko vrijeme na 9,7 min i karakterističan spektar.

Nakon toga, slijedilo je ispitivanje uzorka bolesnika. UV-spektar pika koji izlazi na oko 6,6 min uspoređivan je sa UV-spektrom olanzapina iz baze podataka. Na temelju karakterističnog spektra i maksimalne UV apsorpcije pri 254 nm u vremenu oko 6,6 minuta, UV-spektar spoja čiji kromatografski pik ima retencijsko vrijeme 6,6 minute, prepoznat je kao spektar olanzapina. Pošto je UV-spektar olanzapina iz bolesnikovog uzorka gotovo identičnog izgleda kao i UV-spektar olanzapina iz baze podatak može se zaključiti da nema koeluiranih spojeva i da je kromatografski pik olanzapina bolesnikovog uzorka homogen i čist.

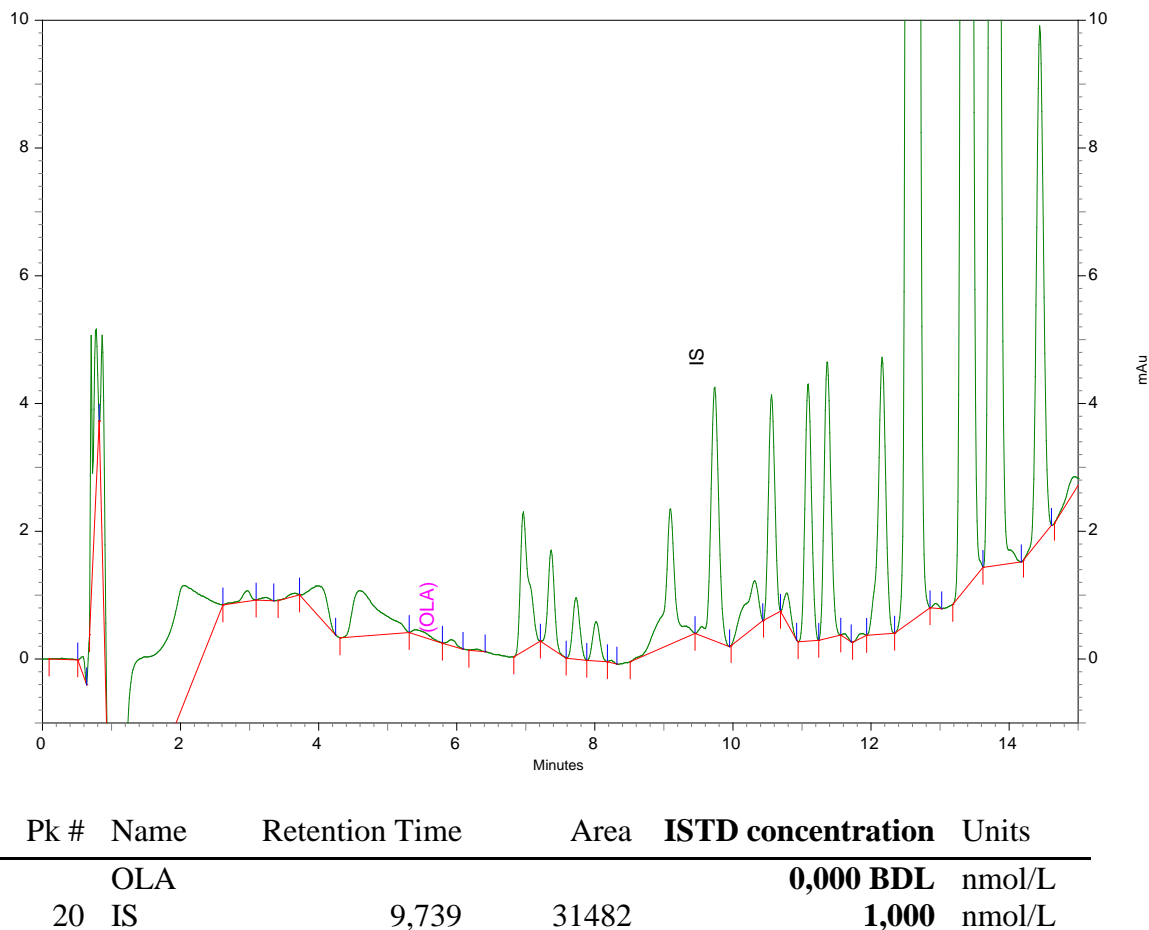


Slika 10. UV-spektri olanzapina dobiveni spektrofotometrijskim detektorom s nizom dioda.

Gornji UV-spektar pripada standardu olanzapina (iz baze podataka), dok je donji spektar dobiven analizom uzorka bolesnika. Može se uočiti sličnost, odnosno preklapanje spektara što ukazuje da je metoda selektivna za olanzapin. Oba spektra pokazuju maksimum apsorpcije pri istoj valnoj duljini te pripadaju pikovima s istim retencijskim vremenima. X os predstavlja raspon valnih duljina UV područja u nm, y os intenzitet apsorpcije (preuzeto iz EZStart 7.4).

Uspoređivanjem UV-spektara (Slika 11) pokazalo se da je metoda selektivna za olanzapin.

Dodatna provjera selektivnosti metode za olanzapin provedena je analizom uzorka seruma koji sadrži više drugih lijekova, ali ne sadrži olanzapin, u prethodno navedenim uvjetima (Slika 11).



Slika 11. Kromatogram uzorka seruma koji ne sadrži olanzapin, a sadrži druge lijekove

Na mjestu eluiranja olanzapina, tj. oko 6,6 min nije se pojavio pik (vidljiv samo šum bazne linije), a ostali lijekovi na kromatogramu izlaze značajno kasnije. Također na tom mjestu nisu prisutni ni drugi pikovi što nam ukazuje da uz korištenje izabranih kromatografskih uvjeta nema interferencija koji bi se koeluirali s olanzapinom. Time je utvrđeno da nisu prisutne endogene niti analizirane egzogene interferencije koje se koeliraju s olanzapinom.

4.2. Linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon

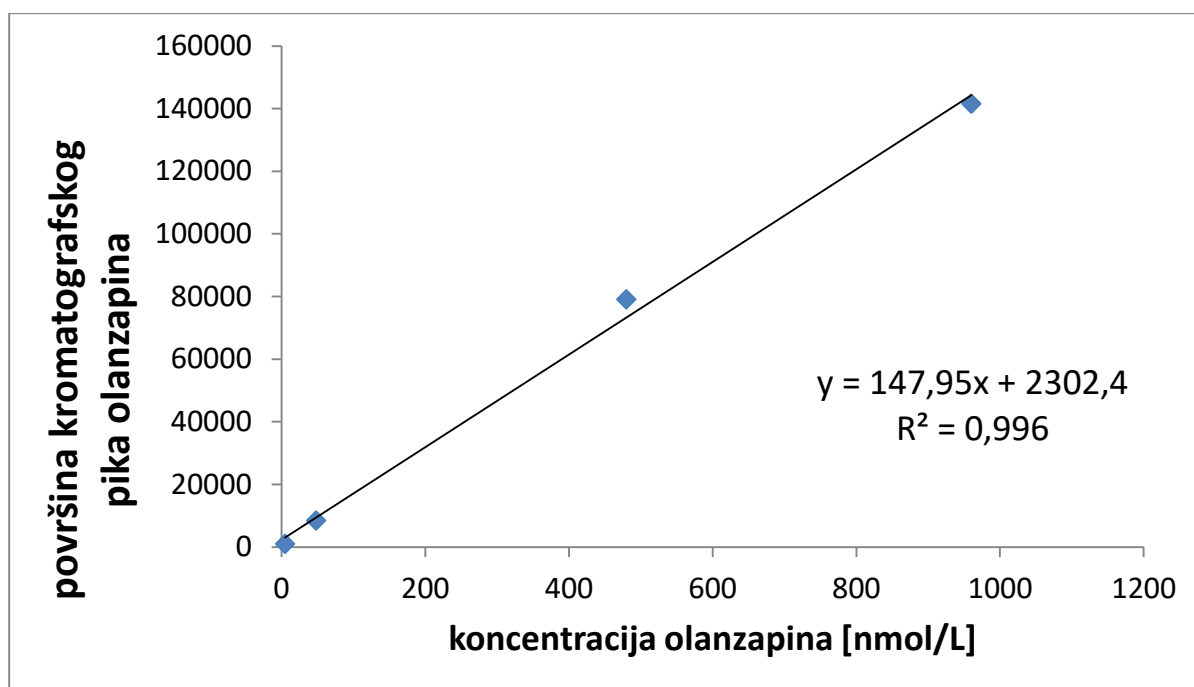
Linearnost kalibracijske krivulje procijenjena je na temelju podataka dobivenih analizom 5 koncentracijskih razina standardne otopine olanzapina koje su pripremljene razrjeđivanjem od najviše prema najnižoj koncentraciji: 1920 nmol/L, 960 nmol/L, 480 nmol/L, 48 nmol/L i 4,8 nmol/L.

Analizom površina pikova ustanovljeno je da najviša koncentracijska točka (1920 nmol/L) značajno odstupa od modela linearne regresije i zbog toga je ta točka odbačena u formiranju kalibracijskog modela. Točka 1920 nmol/L smatra se bjeguncem (*engl.* outlier). Preostale točke su pokazale linearan odnos odgovora detektora i koncentracije olanzapina i stoga su korištene za izradu kalibracijskog pravca.

Tablica 1. Koncentracijske razine i odgovarajuće površine kromatografskih pikova olanzapina.

	razina 1	razina 2	razina 3	razina 4	razina 5
konc. olanzapina [nmol/L]	4,8	48	480	960	1920
površina pika olanzapina	1 036	8 434	79 095	141 505	371 648

Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost površine kromatografskog pika olanzapina o zadanim koncentracijskim razinama olanzapina (Slika 12). Iz jednadžbe pravca je vidljivo da je metoda linearna za koncentracije olanzapina u rasponu od 4,8 do 960 nmol/L.



Slika 12. Provjera linearnosti metode određivanja olanzapina pomoću 4 koncentracijske točke.

Koeficijent korelacije (r^2) iznosi: 0,996, $r = 0,99799$

Nagib pravca (a): 147,95

Odsječak na osi y (b): 2302,4

Linearnost predstavlja sposobnost metode da daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji određivanog analita u traženom koncentracijskom rasponu, a utvrđuje se grafičkim prikazom ovisnosti odziva detektora (os y) o koncentraciji analita (os x).

Zadovoljeni su kriteriji jednadžbe pravca u obliku $y = ax + b$, koeficijent korelacije koji treba biti $r > 0,990$. Iz eksperimentalnih podataka jednadžba pravca za olanzapin dana je izrazom $y = 147,95x + 2302,4$, gdje y vrijednost predstavlja srednju vrijednost odgovora detektora, a x vrijednost predstavlja srednju vrijednost koncentracija. Koeficijent korelacije iznosi $r = 0,99799$.

Rezultati mjerenja pokazuju da je metoda linearna u traženom koncentracijskom području.

4.3. Osjetljivost metode

4.3.1 Granica detekcije (LOD)

LOD je određena izračunom srednje vrijednosti 10 slijepih uzoraka kojoj je pribrojena trostruka standardna devijacija signala slijepih uzorka.

Izračun prema jednadžbi:

$$\text{LOD} = \text{srednja vrijednost} + 3 \times \text{SD}$$

Tablica 2. Rezultati određivanja LOD prema standardnoj devijaciji signala slijepih uzoraka.

slijepi uzorci [nmol/L]	
1.	0,970
2.	1,417
3.	0,000
4.	0,017
5.	0,000
6.	0,000
7.	0,000
8.	1,832
9.	1,245
10.	0,152
Srednja vrijednost	0,5633
Standardna devijacija (SD)	0,723062
Granica detekcije (LOD)	2,732

Izračunata LOD iznosi 2,732 nmol/L. To je najniža koncentracija olanzapina pri kojoj ga metoda može pouzdano razlikovati od pozadinskog šuma, tj. pik olanzapina bit će najmanje 2-3 puta viši od šuma bazne linije. Iako pri toj koncentraciji metoda ne može dati kvantitativan odgovor, važno je znati granicu detekcije metode.

4.3.2 Granica kvantifikacije (LOQ)

LOQ je određena izračunom srednje vrijednosti 10 slijepih uzoraka kojoj je pridružena deseterostruka standardna devijacija signala slijepih uzorka.

Izračun prema jednadžbi:

$$\text{LOQ} = \text{srednja vrijednost} + 10 \times \text{SD}$$

Tablica 3. Rezultati određivanja LOQ prema standardnoj devijaciji signala slijepih uzoraka.

slijepi uzorci [nmol/L]	
1.	0,970
2.	1,417
3.	0,000
4.	0,017
5.	0,000
6.	0,000
7.	0,000
8.	1,832
9.	1,245
10.	0,152
Srednja vrijednost	0,5633
Standardna devijacija (SD)	0,723062
Granica kvantifikacije (LOQ)	7,794

Granica kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može kvantitativno mjeriti (uz odgovarajuću preciznost i točnost).

Na temelju mjerenja vidljivo je da za neka mjerenja postoji minimalni odgovor koji detektor pripisuje olanzapinu. Pošto u tim uzorcima nije prisutan olanzapin, taj odgovor se odnosi na pozadinski šum ili neke druge interferencije. Zbog toga je bitno znati do koje

koncentracije se analit može pouzdano kvantificirati. LOQ se može definirati i kao injektirana količina koja rezultira pikom koji je najmanje 10 puta viši od šuma bazne linije.

Dobivena vrijednost 7,794 nmol/L za LOQ upada u koncentracijsko područje za koje je dokazana linearnost (4,8 – 960 nmol/L). Kvantifikacija ispod LOQ nije prihvatljiva. Prema tome, ispod te vrijednosti metoda može proizvesti samo semi-kvantitativne ili kvalitativne podatke koji nisu u interesu/vidu primjene ove metode. Ovaj podatak o LOQ ukazuje da se kvantifikacija ispod 7,794 nmol/L ne može smatrati pouzdanom.

4.4. Preciznost

4.4.1. Ponovljivost (preciznost u seriji)

U tablici su prikazani rezultati preciznosti u seriji koja je napravljena u dvije koncentracijske razine. Analizirana je serija sa 10 ponavljanja za svaki koncentracijski nivo te su izračunati parametri deskriptivne statistike.

Tablica 4. Preciznost u seriji (ponovljivost)

broj mjerenja serije	razina I [nmol/L]	razina II [nmol/L]
1.	63,955	178,373
2.	60,865	200,741
3.	66,073	195,417
4.	67,555	205,471
5.	68,060	194,943
6.	65,351	192,999
7.	66,089	177,747
8.	67,733	198,053
9.	66,769	195,964
10.	65,777	206,539
srednja vrijednost	65,823	194,625
standardna devijacija	2,1337591	9,791693
koeficijent varijacije, CV [%]	3,242	5,031

Na temelju parametara deskriptivne statistike dobivena je dobra ponovljivost mjerenja u području koje obuhvaćaju analizirane koncentracijske razine. CV za razinu I iznosi 3,242 %, a CV za razinu II je 5,031 %.

Preciznost se općenito definira kao bliskost slaganja između neovisnih rezultata mjerenja dobivenih u postavljenim uvjetima, dok se ponovljivost definira kao preciznost u ponovljivim uvjetima/uvjetima ponovljivosti. CV (ili relativna standardna devijacija) 10 uzastopnih određivanja mora biti do 10 % za koncentracije iznad donje granice kvantifikacije.

Iz eksperimentalnih rezultata izračunat je CV koji je za obje koncentracijske razine unutar kriterija prihvatljivosti, što ukazuje da je metoda precizna u uvjetima ponovljivosti (isti analitičar, ista oprema, isti laboratorij, ista metoda, istovjetni ispitivani uzorci).

Na temelju mjerenja zaključeno je da je metoda ponovljiva, odnosno precizna unutar serije.

4.4.2. Međupreciznost (preciznost iz dana u dan)

U tablici su prikazani su rezultati preciznosti iz dana u dan u dvije koncentracijske razine tijekom 12 dana.

Tablica 5. Preciznost iz dana u dan

dani	razina I [nmol/L]	razina II [nmol/L]
1.	59,4	228,0
2.	57,7	231,0
3.	65,3	208,0
4.	73,1	213,5
5.	63,8	225,5
6.	64,7	192,0
7.	64,4	184,5
8.	71,8	180,5
9.	65,2	199,0
10.	68,9	199,5
11.	64,0	191,7
12.	76,8	218,0
srednja vrijednost	66,3	205,9
standardna devijacija	5,5	17,3
koeficijent varijacije, CV [%]	8,328	8,408

Na temelju mjerenja tijekom 12 dana i izračuna parametara deskriptivne statistike ustanovljeno je da CV za obje koncentracijske razine zadovoljava traženi kriterij (<10 %). Vrijednosti standardnih devijacija za obje koncentracijske razine ukazuju na raspršenje rezultata tijekom više dana i na zadovoljavajuću međupreciznost.

Obje koncentracijske razine su iznad granice kvantifikacije metode i unutar su referentnog raspona za terapijsko praćenje olanzapina u krvi. Stoga je važno da se ovaj validacijski parametar dodatno ispita tijekom većeg broja dana kako bi se preciznost iz dana u dan mogla bolje okarakterizirati.

Dobiveni rezultati za preciznost iz dana u dan ukazuju da su varijacije unutar istog laboratorija koje mogu potjecati od različitih dana u kojima se provodi analiza, prihvatljive i nemaju značajan utjecaj na stvarne vrijednosti rezultata koncentracija olanzapina u biološkom uzorku. U međupreciznost su uključene očekivane promjene tijekom duljeg vremenskog perioda kao što su ponovljene kalibracije s različitim kalibratorima, različiti analitičari, različita oprema itd, što je prisutno u svakodnevnom radu laboratorija pa je važno da navedene promjene nemaju znatan utjecaj na vrijednosti olanzapina koje se obično prate u određenim vremenskim rasponima.

S obzirom na to da je CV za obje koncentracijske razine manji od 10 %, metoda se smatra preciznom između različitih dana tijekom dužeg perioda.

4.5. Točnost

Točnost metode ispitana je za 4 koncentracijske razine, odnosno za 2 kontrolna uzorka (koncentracija 67,3 i 203 nmol/L koje su također korištene za procjenu međupreciznosti) i za još 2 dodatne koncentracijske razine koje su napravljene obogaćivanjem slijepih uzoraka sa standardnom otopinom olanzapina. U tablici su prikazani rezultati točnosti metode koja je određena „*recovery*“ testom.

Recovery test (%) računa se po formuli:

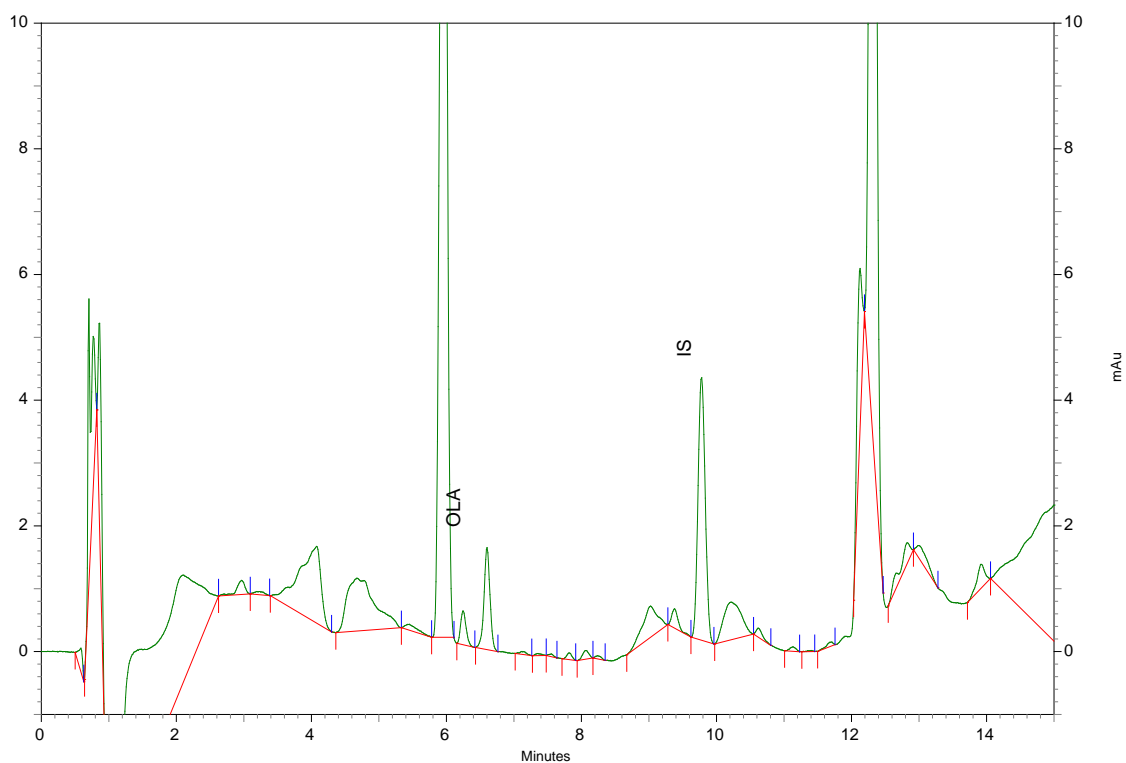
$$RT [\%] = \frac{\text{srednja izmjerena vrijednost olanzapina [nmol/L]}}{\text{očekivana vrijednost olanzapina [nmol/L]}} \times 100$$

Tablica 6. Točnost metode (Recovery test).

koncentracijska razina	srednja izmjerena vrijednost olanzapina [nmol/L]	očekivana vrijednost olanzapina [nmol/L]	recovery test [%]
1.	28,7	32	89,688
2.	66,3	67,3	98,514
3.	205,9	203	101,429
4.	318,5	320	99,531

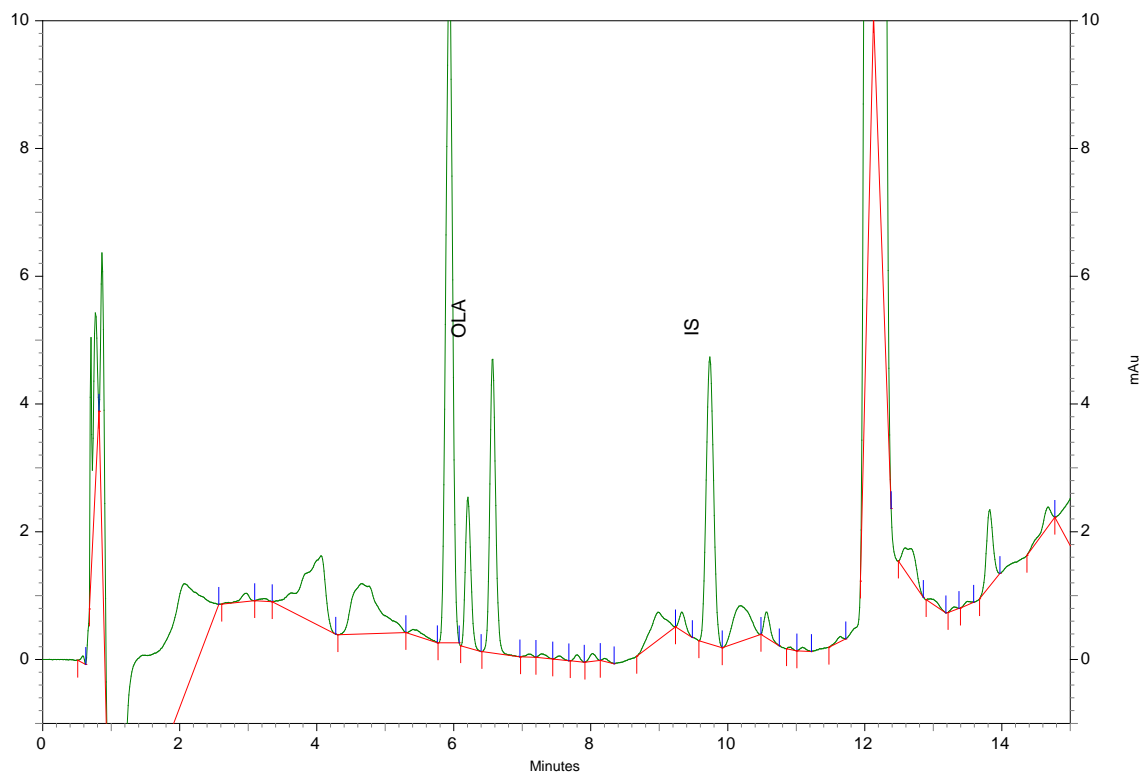
Dobiveni rezultati zadovoljavaju postavljene zahtjeve za točnost metode, koja ukazuje da nema sustavne greške. Točnost metode posebno je važna za subspecijalističke analize u koje se ubrajaju i lijekovi. Važnost korištenja certificiranog kalibracijskog materijala i minimalan bias omogućuju nam korištenje referentnih intervala, za lijekove terapijski raspon, koji se najčešće za subspecijalističke analize preuzima iz literature. Pouzdanost metode ima još veći značaj za kontinuirano praćenje bolesnika, kako se analitička odstupanja ne bi interpretirala kao oscilacije u koncentraciji lijeka koje mogu utjecati na kliničku odluku i nepotrebne promjene doze koje u konačnici mogu biti i štetne za bolesnika.

Vrijednosti „*recovery*“ testa su za sve koncentracijske razine unutar raspona 85 – 115 %, metoda se smatra točnom za kvantitativno određivanje olanzapina. Kromatogrami komercijalnih kontrolnih uzoraka s izmjerenim vrijednostima prikazani su na slikama 13 i 14.



Pk #	Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
12	OLA	6,603	10026	66,073	nmol/L
21	IS	9,781	30994	1,000	nmol/L

Slika 13. Kromatogram dobiven mjerenjem komercijalnog kontrolnog uzorka koji je korišten kao niža koncentracijska razina pri ispitivanju preciznosti i točnosti. Vrijednosti su određene od strane proizvođača: RP TDM3 L I lot. 546 OLANZAPIN 67,3 (53,8-80,7) nmol/L.

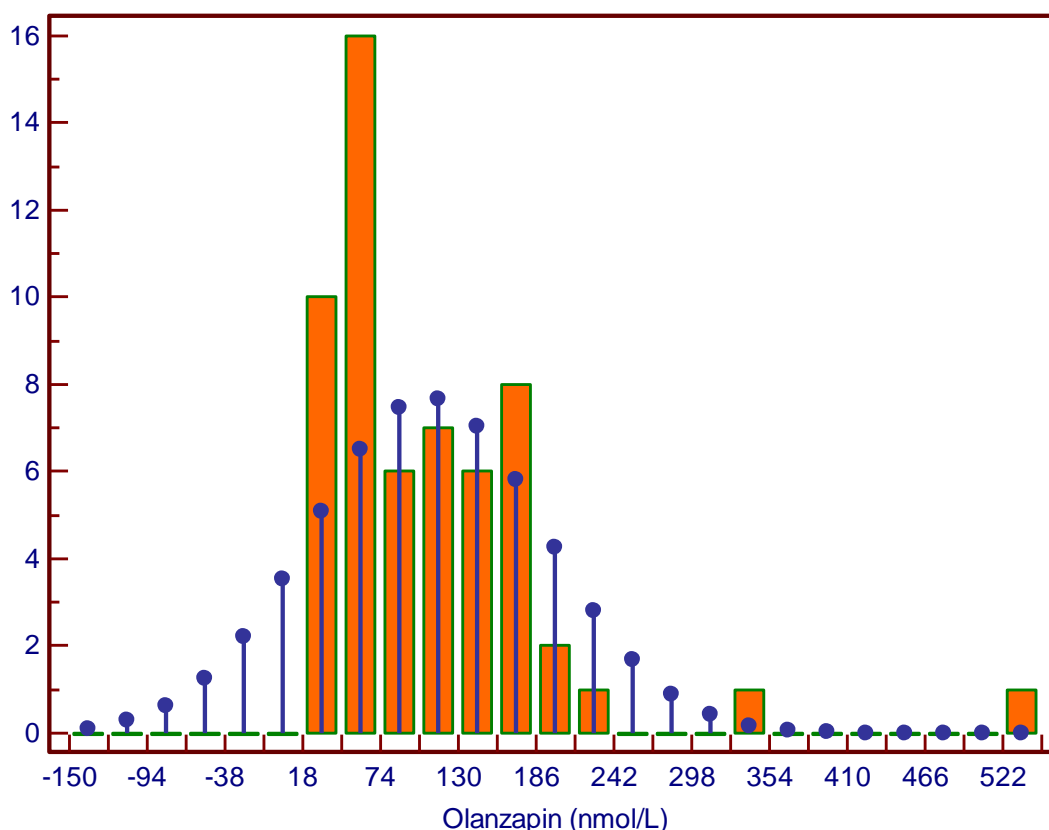


Pk #	Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
12	OLA	6,571	27073	217,013	nmol/L
21	IS	9,739	33699	1,000	nmol/L

Slika 14. Kromatogram dobiven mjerenjem komercijalnog kontrolnog uzorka koji je korišten kao viša koncentracijska razina pri ispitivanju preciznosti i točnosti. Vrijednosti su određene od strane proizvođača: RP TDM3 LII lot. 546 OLANZAPIN 203 (162 - 243) nmol/L.

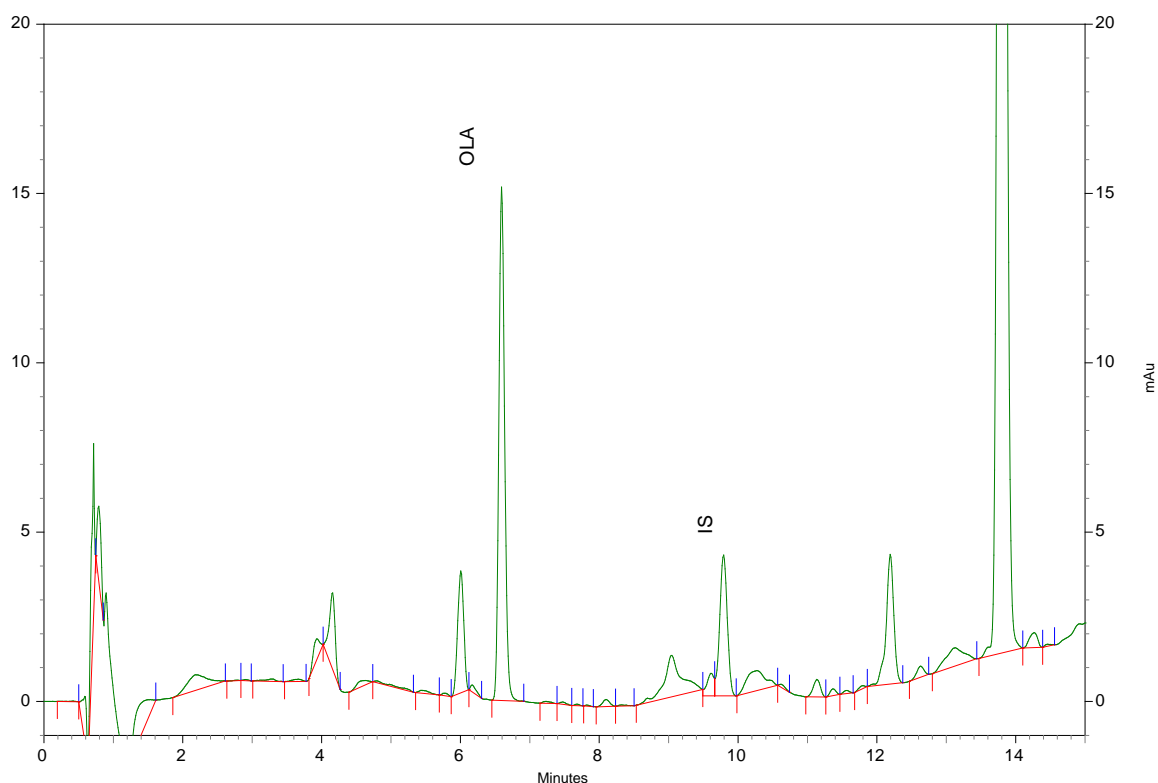
4.6. Referentni interval

Histogram prikazuje vrijednosti koncentracija olanzapina za 58 ispitanika koji nisu podijeljeni prema dobi i spolu. Prema histogramu (Slika 15) vidljiv je pomak izmjerenih koncentracija olanzapina prema donjoj granici referentnog raspona preuzetog iz literature (64 - 256 nmol/L). Statistička obrada pokazala je da koncentracije olanzapina u krvi ne slijede normalnu razdiobu ($P < 0,0001$).



Slika 15. Koncentracije olanzapina u 58 pacijenata prema učestalosti

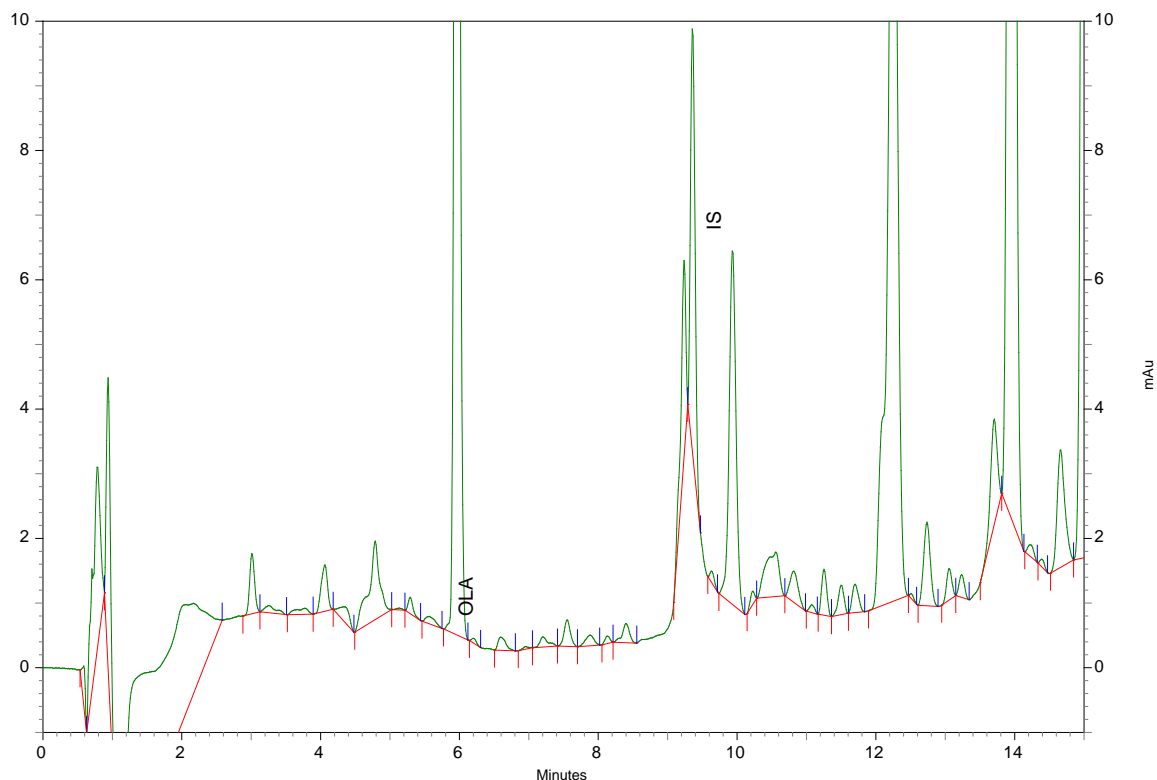
Bolesnici su na terapiji intramuskularnih depo preparata (405 mg, 300 mg svaka 2 do 4 tjedna) ili tableta za peroralnu primjenu (5-30 mg/dan). Svim bolesnicima krv je uzorkovana neposredno prije uzimanja sljedeće doze, nakon što je postignuto ravnotežno stanje lijeka u organizmu i „trough“ koncentracije kako bi se isključile razlike uslijed farmakokinetike. Na slikama 16 i 17 prikazani su kromatogrami bolesnika s vrijednostima olanzapina iznad i ispod terapijskog raspona.



Pk #	Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
19	OLA	6,592	87868	567,874	nmol/L
28	IS	9,792	31605	1,000	nmol/L

Slika 16. Primjer nalaza bolesnika kod kojeg je izmjerena koncentracija olanzapina iznad terapijskog referentnog raspona.

Razlog supratherapijske koncentracije olanzapina može biti pogrešna doza lijeka, istodobna primjena lijeka inhibitora CYP 1A2 metaboličkog puta, kao što je fluvoksamin ili bolesnikova farmakokinetička i farmakodinamička varijabilnost. Značajan problem koji uzrokuje predoziranje olanzapinom je i intramuskularna primjena lijeka koja može dovesti do post-injekcijske toksičnosti pa je potrebno bolesnika pratiti nekoliko sati nakon primjene.



Pk #	Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
16	OLA	6,592	1597	25,075	nmol/L
26	IS	9,931	37234	1,000	nmol/L

Slika 17. Primjer nalaza bolesnika kod kojega je izmjerena subterapijska koncentracija olanzapina.

Subterapijska koncentracija olanzapina može biti uslijed nepridržavanja sheme doziranja, izmijenjene farmakokinetike olanzapina, zbog istodobne primjene lijekova induktora CYP 1A2 metabolizma, kao što je karbamazepin. Intenzivno pušenje također može značajno pridonijeti ovakvom rezultatu.

Važno je napomenuti da su za procjenu terapijskog raspona korišteni svi uzorci bolesnika bez obzira na navike pušenja i lijekove koji bi mogli utjecati na metabolizam olanzapina i posljedično na „trough“ koncentracije. Prema literaturi vrijednosti terapijskog raspona su dobivene na većoj skupini odabranih bolesnika, a isključeni su bolesnici kod kojih se očekuje varijabilna kinetika, a u radu su korišteni svi uzorci bolesnika bez obzira na očekivane intra- i interindividualne varijabilnosti pa su i očekivana blaga odstupanja, što smo analizom i dobili. Svakako treba voditi brigu da su bolesnici vrlo često na politerapiji lijekova

koji imaju sinergistički učinak pa je i ciljano doziranje pojedinog lijeka u politerapiji niže u odnosu na monoterapiju.

Svjesni mogućih predanalitičkih i analitičkih nedostataka, a za poboljšanje točnosti i mogućnost primjene terapijskih raspona iz literature, treba naglasiti da laboratorij sudjeluje u vanjskoj procjeni kontrole kvalitete što svakako pridonosi kvaliteti rada i pouzdanosti dobivenih rezultata.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu validirana je HPLC metoda za kvantitativno određivanje olanzapina u serumu. Za potvrdu olanzapina korišten je detektor s nizom dioda.

Validacijom metode određena je selektivnost, linearnost i koncentracijski raspon, granica detekcije i kvantifikacije, preciznost (ponovljivost i međupreciznost) te točnost. Uz to, ispitan je i terapijski referentni raspon olanzapina u krvi preuzet iz literature.

Iz dobivenih rezultata zaključeno je sljedeće:

- uspoređivanjem dobivenih UV-spektara s onima iz baze podataka pokazano je potpuno razdvajanje olanzapina od ostalih sastavnica uzorka, što potvrđuje selektivnost metode za olanzapin
- metoda je linearna za koncentracije olanzapina u rasponu od 4,8 do 960 nmol/L uz koeficijent korelacije veći od 0,990
- na temelju slijepih uzoraka i standardne devijacije signala slijepih uzoraka utvrđena je osjetljivost metode: LOD 2,732 nmol/L i LOQ 7,794 nmol/L
- dobiveni su koeficijenti varijacije unutar propisanih kriterija (< 10%) koji ukazuju na zadovoljavajuću preciznost i točnost metode koja je potvrđena *recovery* testom
- provjerom terapijskog raspona utvrđeno je da je većina ispitanika (~80 %) unutar referentnog raspona što nam omogućuje rutinsku primjenu raspona iz literature.

Postavljeni proces ekstrakcije i kromatografski uvjeti uz kratko vrijeme analize (20 min za jedan uzorak) čine ovu metodu prikladnom za kvantitativno određivanje olanzapina u serumu. Metoda je pokazala zadovoljavajuću validaciju i kliničku primjenu, ali poželjno je ispitati međupreciznost metode kroz dulje vrijeme. Također treba imati na umu da ova validacija nije obuhvatila ispitivanje stabilnosti uzoraka. Točnost mjerenja i pouzdanost rezultata validacije dodatno potvrđuje i redovito sudjelovanje laboratorija u procjeni vanjske kontrole kvalitete.

Može se zaključiti da je opisana metoda jednostavna, brza i dobro validirana, stoga prikladna za svakodnevnu rutinsku primjenu u laboratoriju u svrhu određivanja koncentracije olanzapina u serumu.

6. LITERATURA

1. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, Beasley CM. Olanzapine Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile. *Clin Pharmacokinet*, 1999, 37, 177-193.
2. Detke HC, McDonnell DP, Brunner E, Zhao F, Sorsaburu S, Stefaniak VJ, Corya SA. Post-injection delirium/sedation syndrome in patients with schizophrenia treated with olanzapine long-acting injection, I: analysis of cases. *BMC Psychiatry*, 2010, 10, 43.
3. Eli Lilly and Company. ZYPREXA® Olanzapine Tablets, ZYPREXA® ZYDIS® Olanzapine Orally Disintegrating Tablets, ZYPREXA® IntraMuscular Olanzapine for Injection. 2004, http://s3-us-west-2.amazonaws.com/drugbank/fda_labels/DB00334.pdf?1265922796, pristupljeno 14.5.2018.
4. General Theory of Column Chromatography, 2016., [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/12_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.2%3A_General_Theory_of_Column_Chromatography), pristupljeno 29.6.2018.
5. Green B. Focus on Olanzapine. *Current Medical Research and Opinion*, 1999, 15, 79-85.
6. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Paulzen M, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Schoretsanitis G, Schwarz M, Gracia MS, Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Unterecker S, Waschler R, Zernig G, Zurek G, Baumann P. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*, 2018, 51, 9-62.
7. High-Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements - Scientific Figure on ResearchGate,

2007., https://www.researchgate.net/Schematic-diagram-of-a-typical-HPLC-or-HPIC-set-up-with-a-binary-gradient-mobile-phase_fig1_227934976, pristupljeno 29.6.2018.

8. Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 196-223.
9. Luterotti S. Validacija bioanalitičkih metoda. U: Odabrane teme iz bioanalitike. Luterotti S, Bičanić D, urednici, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1-34.
10. Mandić D. Uvod u kromatografske separacije. U: Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: elektroforetske i kromatografske separacije. Debeljak Ž, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 73-103.
11. McDonnell DP, Detke HC, Bergstrom RF, Kothare P, Johnson J, Stickelmeyer M, Sanchez-Felix MV, Sorsaburu S, Mitchell MI. Post-injection delirium/sedation syndrome in patients with schizophrenia treated with olanzapine long-acting injection, II: investigations of mechanism. *BMC Psychiatry*, 2010, 10, 45.
12. Meltzer H. Antipsihotici i litij. U: Temeljna i klinička farmakologija. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 489-507.
13. Peters F, Maurer H. Bioanalytical method validation - How, how much and why? A review. *Toxicchem. Krimtech*, 2001, 68, 116-127.
14. Plavšić F, Stavljević A, Vrhovac B. Osnove kliničke farmakokinteike. Zagreb, Školska knjiga, 1992, str. 80-119.

15. Schoretsanitis G, Paulzen M, Unterecker S, Schwarz M, Conca A, Zernig G, Gründer G, Haen E, Baumann P, Bergemann N, Clement HW, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud-Sirot E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Gracia MS, Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Waschgler R, Zurek G, Hiemke C. TDM in psychiatry and neurology: A comprehensive summary of the consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology, update 2017; a tool for clinicians. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2018, 19, 162-174.

7. Sažetak/Summary

Olanzapin, antipsihotik druge generacije, ima visoku kliničku potentnost u uklanjanju simptoma shizofrenije. Zbog vrlo niske ekstrapiramidne toksičnosti, olanzapin se koristi kao lijek izbora umjesto konvencionalnih antipsihotičnih agenasa. S druge strane, moguće nuspojave pri terapijskim dozama, interindividualna varijabilnost farmakokinetike olanzapina, loša adherencija pacijenata i potencijalne lijek-lijek interakcije ukazuju na potrebu pažljivog titriranja doze za svakog pojedinog bolesnika. Individualizacija terapije osniva se na periodičnom praćenju koncentracije lijeka u krvi osjetljivim i selektivnim metodama kao što je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Cilj ovoga rada bio je ispitati pouzdanost HPLC metode u određivanju koncentracije olanzapina. Provedena je validacija parametara specifičnih za kvantitativne in-house metode, a to su: selektivnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), točnost i preciznost (ponovljivost i intermedijarna preciznost). Pri validaciji metode korišteni su komercijalni uzorci i uzorci seruma pacijenata sa psihijatrijskih odjela. Na temelju mjerenja i analize podataka zaključeno je da metoda daje linearan odgovor u rasponu 4,8 – 960 nmol/L, što obuhvaća terapijski referentni raspon olanzapina u krvi (64 – 256 nmol/L). Selektivnost metode je potvrđena detektorom s nizom dioda na temelju uspoređivanja UV-spektara olanzapina. Definirana je i LOQ vrijednost od 7,794 nmol/L, dok je LOD iznosi 2,732 nmol/L. Rezultati ispitivanja preciznosti i točnosti zadovoljili su postavljene kriterije. Preciznost iz dana u dan ispitana je tijekom samo 12 dana. Dodatno je provedena verifikacija referentnog terapijskog raspona olanzapina u krvi na 58 ispitanika. Koncentracija olanzapina u krvi ne slijedi normalnu razdiobu, vrijednosti su pomaknute prema nižim koncentracijama referentnog raspona. U obzir nije uzet status pušenja, dodatna terapija i druge intra- i interindividualne varijabilnosti pa su ovakvi rezultati očekivani. Metoda je pokazala zadovoljavajuću validaciju i kliničku primjenu, ali poželjno je ispitati međupreciznost metode kroz dulje vrijeme. Također treba imati na umu da ova validacija nije obuhvatila ispitivanje stabilnosti uzoraka. Točnost mjerenja i pouzdanost rezultata validacije dodatno potvrđuje i redovito sudjelovanje laboratorija u procjeni vanjske kontrole kvalitete.

Olanzapine, second-generation antipsychotic, has high clinical potential in removing symptoms of schizophrenia. Because of very low extrapyramidal toxicity, olanzapine is drug of choice, instead of conventional antipsychotic drugs. On the other hand, because of possible side effects at therapeutic doses, interindividual variability of pharmacokinetics, poor patient adherence and potential drug-drug interactions, careful dose titration is necessary for every patient. Individualization of therapy is based on periodical following of blood drug concentration with sensitive and selective methods such as high performance liquid chromatography. Aim of this study was to examine reliability of HPLC method in quantification of olanzapine. Validation of parameters for specific quantitative in-house methods was performed, namely: selectivity, linearity, limit of detection and quantification (LOD and LOQ), accuracy and precision (repeatability and intermediate precision). For method validation commercial samples and serum samples of patients from departments of psychiatry were used. Based on measurement and data analysis it was concluded that the method provides linear response in the range of 4,8 – 960 nmol/L, which includes therapeutic reference range for olanzapine in blood (64-256 nmol/L). Selectivity of the method is confirmed by a diode array detector based on comparing of UV-spectra of olanzapine. A LOQ value of 7,796 nmol/L and LOD of 2,732 nmol/L were also defined. The precision and accuracy results met the set criteria. However, day-to-day precision was examined only during 12 days. Additionally, verification of therapeutic reference range for olanzapine in blood is conducted on 58 patients' samples. Concentration of olanzapine in blood does not follow normal distribution and values are shifted to lower concentrations of reference range. Status of smoking, additional therapy and other intra- and interindividual variabilities were not considered so these results were expected. Method has shown satisfactory validation and clinical application, but it is desirable to examine intermediate precision during longer period of time. Also, it should be kept in mind that this validation did not include evaluation of stability of samples. Accuracy of measurements and reliability of validation results are additionally confirmed by regular participation of laboratory in external quality control assessment.

8. Prilozi

8.1. Popis kratica

ADR	nuspojave (<i>engl.</i> adverse drug reactions)
C/D	omjer koncentracije lijeka i doze
CF	faktor pretvorbe (<i>engl.</i> conversion factor)
CV	koeficijent varijacije
CYP	citokrom P450
DAD	detektor s nizom dioda (<i>engl.</i> diode array detector)
DMSO	dimetilsulfoksid
DRC	koncentracija lijeka povezana s dozom (<i>engl.</i> dose-related drug concentration)
FMO3	flavin monooksigenaza
GLP	dobra laboratorijska praksa (<i>engl.</i> good laboratory practice)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>engl.</i> high performance liquid chromatography)
IS	unutarnji standard (<i>engl.</i> internal standard)
LAI	dugodjelujuća injekcija (<i>engl.</i> long-acting injectable)
LI	koncentracijska razina 1 (<i>engl.</i> level 1)
LII	koncentracijska razina 2 (<i>engl.</i> level 2)
LLE	ekstrakcija tekuće-tekuće (<i>engl.</i> liquid-liquid extraction)
LLOQ	donja granica kvantifikacije (<i>engl.</i> lower limit of quantification)
LOD	granica detekcije (<i>engl.</i> limit of detection)
MPR	omjer metabolita i roditeljskog lijeka (<i>engl.</i> metabolite to parent drug ratio)
MS	maseni spektrometar
PDA	detektori s nizom dioda (<i>engl.</i> photo diode array)
PPT	precipitacija ili taloženje proteina (<i>engl.</i> protein precipitation)
RPLC	kromatografija obrnutih faza (<i>engl.</i> reverse-phase liquid chromatography)
RT	<i>recovery</i> test
SD	standardna devijacija
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (<i>engl.</i> solid phase extraction)
TDM	terapijsko praćenje koncentracije lijeka (<i>engl.</i> therapeutic drug monitoring)
ULOQ	gornja granica kvantifikacije (<i>engl.</i> upper limit of quantification)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Terapijsko praćenje olanzapina: Validacija metode i klinička primjena

Mihovil Horvat

SAŽETAK

Olanzapin, antipsihotik druge generacije, ima visoku kliničku potentnost u uklanjanju simptoma shizofrenije. Zbog vrlo niske ekstrapiramidne toksičnosti, olanzapin se koristi kao lijek izbora umjesto konvencionalnih antipsihotičnih agenasa. S druge strane, moguće nuspojave pri terapijskim dozama, interindividualna varijabilnost farmakokinetike olanzapina, loša adherencija pacijenata i potencijalne lijek-lijek interakcije ukazuju na potrebu pažljivog titriranja doze za svakog pojedinog bolesnika. Individualizacija terapije osniva se na periodičnom praćenju koncentracije lijeka u krvi osjetljivim i selektivnim metodama kao što je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Cilj ovoga rada bio je ispitati pouzdanost HPLC metode u određivanju koncentracije olanzapina. Provedena je validacija parametara specifičnih za kvantitativne in-house metode, a to su: selektivnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije (LOD i LOQ), točnost i preciznost (ponovljivost i intermedijarna preciznost). Pri validaciji metode korišteni su komercijalni uzorci i uzorci seruma pacijenata sa psihijatrijskih odjela. Na temelju mjerenja i analize podataka zaključeno je da metoda daje linearan odgovor u rasponu 4,8 – 960 nmol/L, što obuhvaća terapijski referentni raspon olanzapina u krvi (64 – 256 nmol/L). Selektivnost metode je potvrđena detektorom s nizom dioda na temelju uspoređivanja UV-spektara olanzapina. Definirana je i LOQ vrijednost od 7,794 nmol/L, dok je LOD iznosi 2,732 nmol/L. Rezultati ispitivanja preciznosti i točnosti zadovoljili su postavljene kriterije. Preciznost iz dana u dan ispitana je tijekom samo 12 dana. Dodatno je provedena verifikacija referentnog terapijskog raspona olanzapina u krvi na 58 ispitanika. Koncentracija olanzapina u krvi ne slijedi normalnu razdiobu, vrijednosti su pomaknute prema nižim koncentracijama referentnog raspona. U obzir nije uzet status pušenja, dodatna terapija i druge intra- i interindividualne varijabilnosti pa su ovakvi rezultati očekivani. Metoda je pokazala zadovoljavajuću validaciju i kliničku primjenu, ali poželjno je ispitati međupreciznost metode kroz dulje vrijeme. Također treba imati na umu da ova validacija nije obuhvatila ispitivanje stabilnosti uzoraka. Točnost mjerenja i pouzdanost rezultata validacije dodatno potvrđuje i redovito sudjelovanje laboratorija u procjeni vanjske kontrole kvalitete.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 54 stranica, 17 grafičkih prikaza, 6 tablica i 15 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Olanzapin, TDM, HPLC, validacija

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Mila Lovrić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Višnja Drinovac-Vlah, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Therapeutic drug monitoring of olanzapine: method validation and clinical application

Mihovil Horvat

SUMMARY

Olanzapine, second-generation antipsychotic, has high clinical potential in removing symptoms of schizophrenia. Because of very low extrapyramidal toxicity, olanzapine is drug of choice, instead of conventional antipsychotic drugs. On the other hand, because of possible side effects at therapeutic doses, interindividual variability of pharmacokinetics, poor patient adherence and potential drug-drug interactions, careful dose titration is necessary for every patient. Individualization of therapy is based on periodical following of blood drug concentration with sensitive and selective methods such as high performance liquid chromatography. Aim of this study was to examine reliability of HPLC method in quantification of olanzapine. Validation of parameters for specific quantitative in-house methods was performed, namely: selectivity, linearity, limit of detection and quantification (LOD and LOQ), accuracy and precision (repeatability and intermediate precision). For method validation commercial samples and serum samples of patients from departments of psychiatry were used. Based on measurement and data analysis it was concluded that the method provides linear response in the range of 4,8 – 960 nmol/L, which includes therapeutic reference range for olanzapine in blood (64-256 nmol/L). Selectivity of the method is confirmed by a diode array detector based on comparing of UV-spectra of olanzapine. A LOQ value of 7,796 nmol/L and LOD of 2,732 nmol/L were also defined. The precision and accuracy results met the set criteria. However, day-to-day precision was examined only during 12 days. Additionally, verification of therapeutic reference range for olanzapine in blood is conducted on 58 patients' samples. Concentration of olanzapine in blood does not follow normal distribution and values are shifted to lower concentrations of reference range. Status of smoking, additional therapy and other intra- and interindividual variabilities were not considered so these results were expected. Method has shown satisfactory validation and clinical application, but it is desirable to examine intermediate precision during longer period of time. Also, it should be kept in mind that this validation did not include evaluation of stability of samples. Accuracy of measurements and reliability of validation results are additionally confirmed by regular participation of laboratory in external quality control assessment.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 54 pages, 17 figures, 6 tables and 15 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Olanzapine, TDM, HPLC, validation

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mila Lovrić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Višnja Drinovac-Vlah, Ph.D. Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2018.

